



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LA FUENTE, CONCENTRACIÓN Y RELACIÓN DE CARBONO NITRÓGENO (C: N) SOBRE LA FORMACIÓN DE CONIDIOS DE *Penicillium* sp. HC1 EN MEDIO LÍQUIDO

Dinary Eloisa Durán Sequeda

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Posgrado Interfacultades en Microbiología
Bogotá, Colombia
2017

EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LA FUENTE, CONCENTRACIÓN Y RELACIÓN DE CARBONO NITRÓGENO (C:N) SOBRE LA FORMACIÓN DE CONIDIOS DE *Penicillium* sp. HC1 EN MEDIO LÍQUIDO

Dinary Eloisa Durán Sequeda

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Microbiología

Directora:

MSc., Nubia Moreno Sarmiento

Codirectora:

cPh.D., Ivonne Gutierrez Rojas

Línea de Investigación:

Bioinsumos

Grupo de Investigación:

Bioprocesos y Bioprospección

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Posgrado Interfacultades en Microbiología

Bogotá, Colombia

2017

*Dedicado a con amor a mi familia y en especial
a Alba, Eduardo y José*

Agradecimientos

Son muchas las personas a las que con todo mi corazón les agradezco por su participación en este proceso y aunque deje de mencionar muchos nombres el sentimiento de gratitud es igual.

Agradezco a Nubia Moreno y a Ivonne Gutiérrez, por recibirme y aceptar ser mis orientadoras en este proceso, la promesa de que iba a aprender mucho quedó cumplida y los aprendizajes más importantes que me han dejado trascienden lo académico. Gracias por sus críticas, por su apoyo, su paciencia y su cariño.

Gracias a Jeimy Macias, Diana Vergara, Diana Vinchira, Elsy Bermudez, Ivan Cabezas y Daniel Mendez, por su compañía, su amistad y disposición incondicional para ayudarme y a todos los compañeros del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional (IBUN).

Al personal del Laboratorio de Marinos de la Universidad Nacional de Colombia, por su ayuda técnica en el proceso de cromatografía, al laboratorio de Microbiología de la Universidad Javeriana y muy especialmente a Balkys Quevedo por permitirme trabajar en su espacio las veces necesarias.

Al posgrado Interfacultades de Microbiología, a su Coordinador Daniel Uribe y a la Profesora Martha Raquel Fontanilla por ser críticos en sus opiniones pero al tiempo cálidos y respetuosos. A Socorro Prieto, por toda su paciencia, su trabajo excelente y apoyo administrativo.

Gracias a mi mamá Alba Sequeda por su tenacidad y su amor incondicional, a José Pérez por ser mi compañero, mi amigo, mi apoyo, por todo lo que sacrificó por mí en este tiempo. A Eduardo por su amor. Gracias a mi familia, toda. Gracias a Dios.

Resumen

Penicillium sp. HC1 es un hongo celulolítico y xilanolítico que fue aislado a partir de un tamizaje de microorganismos con actividad celulolítica en suelos rizosféricos de cultivos de arroz en el Departamentos del Tolima, Colombia. La alianza Biocultivos S.A y La Universidad Nacional de Colombia a través del IBUN lo seleccionaron para la formulación de un bioinoculante. Para la producción del bioinoculante a gran escala se requiere conocer las condiciones de fermentación sumergida que induzcan una alta producción de conidios tolerantes a condiciones de estrés entre ellas el estrés térmico. Estudios previos mostraron que la fuente de carbono afectaba significativamente la producción de conidios en medio líquido y que en un medio con glucosa y nitrato de potasio la termotolerancia de los conidios aumentaba conforme se aumentaba la relación C:N. En este estudio se determinó el efecto de los factores, fuente de carbono, concentración de carbono, fuente de nitrógeno, relación de C:N y sus interacciones en la producción de conidios y en las características de calidad: viabilidad y tolerancia térmica. La concentración de carbono y relación C:N resultaron ser los factores con mayor significancia estadística en la producción y la calidad de los conidios, pero su efecto depende del tipo de fuentes de carbono o nitrógeno usada. Un perfil de germinación y una caracterización microscópica se realizaron a medios en los que se produjeron conidios de alta y baja tolerancia térmica. Como posibles variables de calidad asociadas a la tolerancia térmica se determinó la acumulación de manitol, trehalosa y cambios en la superficie de la pared celular de los conidios de *Penicillium* sp. HC1. Se encontró que conidios con alta tolerancia térmica producidos en medios de cultivo líquido que contienen sacarosa como fuente de carbono acumularon cerca de 90 mg/g de manitol. Sólo los conidios producidos en un medio de cultivo evaluado acumularon trehalosa a una concentración de 20 mg/g. Aunque los cambios en la

superficie de los conidios no se pudieron asociar a la termotolerancia de los conidios de *Penicillium* sp. HC1. la combinación de la fuentes y las concentraciones evaluadas en los medios seleccionados presentaron cambios en el tamaño y variaciones en los patrones de ornamentación, estos patrones fueron predominantemente cerebriformes. Los resultados indican que *Penicillium* sp. HC1 es un hongo muy sensible a las condiciones nutricionales de crecimiento, capaz de sensar y responder no sólo los tipos de fuentes de carbono o nitrógeno sino también las concentraciones y relaciones de C:N de la fuentes.

Palabras claves: *Penicillium*, conidios, tolerancia térmica, conidiogénesis, trehalosa, manitol, pared celular, carbono, nitrógeno, C:N

Abstract

Penicillium sp. HC1 is a cellulolytic and xylanolytic fungus. It was isolated from a screening of microorganisms with cellulolytic activity in rhizosphere soils used for rice culture in Tolima, Colombia. The company “Alianza Biocultivos S.A” and “Universidad Nacional de Colombia” had previously selected the produced conidia to formulate a bioinoculant. When used with this purpose, the conidia production is required in high scale. Previous studies showed that the carbon source has a significant effect on the production of conidia in liquid media and that in a medium with potassium nitrate and glucose, the thermal tolerance of conidia rises if the C:N ratio is also increased. In the present study, the effect of carbon source, nitrogen source, carbon concentration, C:N ratio, and the interaction between these variables on the conidia production was studied. Other response variables were the quality of produced conidia and their thermal tolerance. Mannitol and trehalose concentration changes, alongside with possible surface changes on the conidia cell wall were believed to allow for correlation between conidia quality and their thermal tolerance. It was found that conidia that exhibit high thermal tolerance in cultures that use saccharose as carbon source, accumulated around 90 mg/g of mannitol. Trehalose accumulation and surface changes could not be correlated to thermal tolerance in conidia from *Penicillium* sp. HC..

Keywords: conidiation, conidia, trehalose, mannitol, *Penicillium*, cell wall, C:N ratio, carbon, nitrogen, thermal stress resistance

Contenido

	Pág.
Agradecimientos	vi
Resumen	vii
Lista de figuras.....	xiii
Lista de tablas	xv
Introducción	1
1. Justificación y planteamiento del problema	5
2. Marco teórico.....	9
2.1 Generalidades del género <i>Penicillium</i>	9
2.2 Ciclo de vida asexual del género <i>Penicillium</i>	11
2.2.1 Germinación.....	12
2.2.2 Crecimiento vegetativo	14
2.2.3 Conidiogénesis.....	19
2.2.4 Conidiogénesis microcíclica	21
2.2.5 Factores que promueven la conidiogénesis	23
Adición de calcio	23
Acumulación de conidiogenona y conidiogenol	24
Fuente de nitrógeno y limitación por nitrógeno	25
Fuente de carbono y limitación por carbono.....	26
2.3 Características de los conidios del género <i>Penicillium</i>	26
2.3.1 Organización de la pared celular, rodlets y ornamentos	26
2.3.2 Contenido de trehalosa y manitol	30
2.4 Antecedentes.....	34
2.4.1 <i>Penicillium</i> sp. HC1	34
2.4.2 Influencia de la fuente de carbono y nitrógeno en la conidiogénesis de <i>Penicillium</i> sp. HC1 en medio de cultivo sólido y líquido.....	34
2.5 Objetivos.....	38
2.5.1 Objetivo general	38
2.5.2 Objetivos específicos	38
3. 3. Metodología	39
3.1 Medios de cultivo y condiciones de cultivo	39
3.1.1 Banco de trabajo y obtención del inóculo	39
3.1.2 Medios de cultivo	40
3.2 Determinación de biomasa en peso seco.	40

3.3	Determinación del número de conidios.....	41
3.4	Determinación de la viabilidad de los conidios	41
3.5	Determinación de la tolerancia a condiciones de estrés térmico.....	41
3.6	Determinación del contenido de Trehalosa y manitol	42
3.6.1	Obtención de los conidios.....	42
	Determinación del contenido de trehalosa y manitol por HPLC.....	42
3.7	Microscopia electrónica de barrido	43
3.8	Caracterización Microscópica.....	43
3.9	Perfil de germinación.....	44
4	Resultados y discusión de resultados	45
4.1	Influencia de la fuente de carbono y nitrógeno, la concentración de carbono y la relación C:N, en medio líquido, sobre la producción de conidios de <i>Penicillium</i> sp. HC1 y su tolerancia a estrés térmico.....	45
4.2	Cambios en la superficie de la pared celular de los conidios de <i>Penicillium</i> sp. HC1 y su relación con la tolerancia térmica	58
4.2.1	Perfil de germinación de los conidios <i>Penicillium</i> sp HC1 en medios donde se producen conidios con diferente tolerancia a condiciones de estrés térmico	58
4.2.2	Caracterización microscópica de los conidióforos de <i>Penicillium</i> sp. HC1 según los medios en donde se producen conidios tolerantes a estrés térmico	63
3.1.1	Cambios de la superficie de la pared celular de los conidios de <i>Penicillium</i> sp. HC1 con tolerancia diferencial a condiciones de estrés térmico.....	69
3.2	Contenido de trehalosa y manitol de conidios de <i>Penicillium</i> sp HC1 en medios de cultivos que producen conidios de alta y baja tolerancia térmica	75
5	Conclusiones y recomendaciones	83
	Conclusiones	83
	Recomendaciones	84
A.	Anexo: Composición de medios de cultivo con sacarosa.....	87
B.	Anexo: Composición de medios de cultivo con harina de almidón.....	89
C.	Solución de micronutrientes.....	91
D.	Anexo: Datos diseño factorial.....	93
E.	Anexo: Gráficos de diagnóstico y evaluación de supuestos del modelo estadístico variable: Biomasa.....	97
F.	Anexo: Gráficos de diagnóstico número de conidios.....	99
G.	Anexo: Gráficos de diagnóstico Germinación.....	101
H.	Anexo: Gráficos de diagnóstico Tolerancia transformada	103
I.	Anexo: Regresión factorial y gráficos de efectos principales e interacciones: Biomasa	105
J.	Anexo: Regresión factorial, gráficos de efectos principales e interacciones número de conidios.....	107

K. Anexo: Gráficos de efectos principales e interacciones Germinación	109
 L. Anexo: Gráficos de efectos principales e interacciones Tolerancia transformada	111
M. Anexo: Cromatograma.....	113
 N. Anexo: Medios seleccionados para caracterización microscópica y cuantificación de manitol y trehalosa	115
 Medios de cultivos seleccionados para la producción de conidios y determinación de trehalosa, manitol y superficie de la pared	115
 O. Anexo: Análisis estadístico para caracterización microscópica de conidióforos y conidios	117
Bibliografía	128

Lista de figuras

	Pág.
Figura 2-1: Ciclo de vida de los hongos de la familia <i>Trichocomaceae</i> (Wyatt et al. 2013).	10
Figura 2-2: Ciclo de vida asexual de <i>Penicillium</i> sp. (Canteri & Ghoul 2015).	11
Figura 2-3: Esquema de los cambios morfológicos de <i>Penicillium megasporum</i> en proceso de germinación (Remsen et al. 1967).	13
Figura 2-4: Modelo de la estructura morfológica para el crecimiento de hongos filamentosos en cultivo sólido (Nielsen 1993; Ugalde 2006).	15
Figura 2-5: Modelo de la estructura morfológica para el crecimiento de <i>Penicillium chrysogenum</i> en cultivo sumergido (Paul & Thomas 1996).	17
Figura 2-6: Morfología macroscópica del pellet (Nielsen 1996).	18
Figura 2-7: Regiones identificables en un pellet fúngico y gradiente de oxígeno dentro del pellet. (Espinosa-Ortiz et al. 2016).	19
Figura 2-8: Estados morfológicos de <i>Penicillium cyclopium</i> durante el proceso de conidiogénesis en medio de cultivo líquido (Roncal & Ugalde 2003).	20
Figura 2-9: Tipos de conidióforos de los <i>Penicillium</i> (Visagie et al. 2014).	21
Figura 2-10: Cambios morfológicos durante la conidiogénesis microcíclica de <i>P. urticae</i> . (Sekiguchi et al. 1975).	22
Figura 2-11: Estructura química de la conidiogénona y el coniodogénol (Cordobe et al. 2002).	24
Figura 2-12: Ilustración de la morfología de un conidio de <i>Penicillium megasporum</i> , su organización interna y pared celular con múltiples capas (Moss 1987) y (Remsen et al. 1967).	27
Figura 2-13: Microfotografías de la superficie de los conidios de <i>Penicillium digitatum</i> y <i>Penicillium herquei</i> (Hess et al. 1968).	28
Figura 2-14: Microfotografías del tipo de ornamentos presentes en conidios de diferentes especies de <i>Penicillium</i> (Martínez et al. 1982).	30
Figura 2-15: Metabolismo de la trehalosa en hongos (Fillinger et al. 2001).	32
Figura 2-16: Metabolismo del manitol <i>Aspergillus niger</i> (Ruijter et al. 2003).	33
Figura 2-17: Conidióforos y conidios de <i>Penicillium</i> sp. HC1 después de 4 días de incubación a 28°C en diferentes medios (Gutiérrez-Rojas et al. 2015).	35
Figura 2-18: Supervivencia de <i>Penicillium</i> sp. HC1 obtenidos en diferentes medios de cultivo expuestos a estrés térmico (Gutiérrez-Rojas et al. 2015).	36

Figura 2-19: Efecto de la relación carbono: nitrógeno sobre la tolerancia a la tolerancia térmica de los conidios <i>Penicillium</i> sp. HC1(Gutiérrez-Rojas et al. 2015).....	37
Figura 4 -1: Efecto de la fuente de carbono, concentración inicial de la fuente de carbono, fuente de nitrógeno y relación C:N en la producción de biomasa y conidios de <i>Penicillium</i> sp HC1, en medio líquido.	47
Figura 4 -2: Efecto de la fuente de carbono, concentración inicial de la fuente de carbono, fuente de nitrógeno y relación C:N en la producción de conidios de <i>Penicillium</i> sp HC1, en medio líquido.	51
Figura 4 -3: Efecto de la fuente de carbono, concentración inicial de la fuente de carbono, fuente de nitrógeno y relación C:N en la viabilidad de conidios de <i>Penicillium</i> sp HC1, en medio líquido.....	53
Figura 4 -4: Efecto de la fuente de carbono, concentración inicial de la fuente de carbono, fuente de nitrógeno y relación C:N en la tolerancia térmica de <i>Penicillium</i> sp HC1, en medio líquido.....	54
Figura 4-5: Perfil de germinación de conidios de <i>Penicillium</i> sp HC1 inoculados en medios que producen conidios con diferente tolerancia a estrés térmico.	59
Figura 4 -7: Perfil de germinación de conidios de <i>Penicillium</i> sp HC1 inoculados en medios que producen conidios con diferente estrés térmico.	61
Figura 4 -7: Conidióforos de <i>Penicillium</i> sp HC1 en medios seleccionados por producir conidios con diferente tolerancia térmica que contienen sacarosa.	65
Figura 4 -8: Conidióforos de <i>Penicillium</i> sp HC1 en medios seleccionados por producir conidios con diferente tolerancia térmica que contienen harina de almidón	68
Figura 4 -9: Características microscópicas de los conidios de <i>Penicillium</i> sp HC1 en Agar Papa Dextrosa.....	69
Figura 4 -10: Características microscópicas de los conidios de <i>Penicillium</i> sp HC1 producidos en medios con sacarosa.	71
Figura 4 -11: Características microscópicas de los conidios de <i>Penicillium</i> sp HC1 en medios con harina de almidón.	72
Figura 4 -12: Viabilidad, tolerancia térmica y contenido de Thehalosa y Manitol en conidios de <i>Penicillium</i> sp HC1 en medios líquidos que contienen sacarosa como fuente de carbono.	76
Figura 4 -13: Viabilidad, tolerancia térmica y contenido de Thehalosa y Manitol en conidios de <i>Penicillium</i> sp HC1 que contienen harina de almidón como fuente de carbono.	78
Figura 4-11: Análisis de componentes principales	82

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 2-1: Tipo de ornamentos presentes en la superficie de los conidios de <i>Penicillium</i> (Martinez et al. 1982).....	29
Tabla 2-2: Medios de cultivos según fuente de carbono y nitrógeno (Gutiérrez-Rojas et al. 2015) .	34
Tabla 2-3: Efecto de las fuentes de carbono y nitrógeno en la producción de conidios, en medios sólidos y líquidos (Gutiérrez-Rojas et al. 2015).	36
Tabla 4-1: ANOVA del efecto de la fuente de carbono (C) y nitrógeno (N), la concentración inicial de carbono y la relación C: N en la producción de biomasa, conidios, viabilidad y tolerancia térmica de los conidios de <i>Penicillium</i> sp. HC1.	46

Introducción

Penicillium sp. HC1, es un hongo que presenta actividad celulolítica y xilanolítica, se seleccionó de un estudio de microorganismos celulolíticos aislados de suelos rizosféricos de cultivos de arroz ubicados en los departamentos de Tolima y Meta, Colombia (Gutiérrez-Rojas et al., 2012). Este aislamiento ha sido depositado en el *Centraalbureau voor Schimmelcultures Fungal Biodiversity Center* (CBS-KNAW) como CBS 136205 (Gutiérrez-Rojas et al. 2015). La alianza Biocultivos S.A y la Universidad Nacional de Colombia a través del Instituto de Biotecnología (IBUN) lo seleccionó para la formulación de un bioinoculante, a partir de las formas de propágulo del hongo, los conidios, obtenidos en medio líquido. El uso de este bioinoculante estará destinado a la degradación de residuos agrícolas como el tamo de arroz.

El género *Penicillium* agrupa diversas especies de hongos filamentos perteneciente a los Ascomycetes (Malloch & Cain 1972; Frisvad & Samson 2004) para este grupo de hongos el ciclo de vida puede transcurrir entre los estados de reproducción sexual y asexual (Wyatt et al. 2013). Cuando los Ascomycetes como *Penicillium* tienen ambos ciclos de vida se pueden generar dos tipos de esporas: las sexuales llamadas ascosporas y las esporas asexuales llamadas conidios (Pitt 1995; Böhm et al. 2013; Wyatt et al. 2013). El interés de este trabajo se centra en el ciclo asexual del hongo y en la generación de conidios, que ocurren en la etapa denominada conidiogénesis. La conidiogénesis normalmente ocurre cuando una hifa, sensea un estímulo ambiental que detiene su crecimiento y ésta se diferencia en una célula conidiogénica llamada fiálide (Roncal & Ugalde 2003). De una misma hifa pueden aparecer diversas fiálides que forman una estructura característica llamada conidióforo; en el caso de *Penicillium* el conidióforo tiene forma de pequeñas brochas lo que dio origen al nombre del género (Visagie et al. 2014).

Estudios previos demostraron que la producción y calidad de los conidios *Penicillium* sp. HC1, están afectados por el estado del medio de cultivo: líquido o sólido y que la producción y calidad de los conidios también dependen de la fuente de carbono y nitrógeno usada, así como de la combinación de ambas fuentes. En medio líquido se obtuvieron los conidios con mayor tolerancia térmica y en esta condición, medios con combinaciones de una fuente de carbono compleja con una fuente de nitrógeno inorgánica llegaron a presentar los más altos porcentaje de tolerancia a diferentes condiciones de estrés. En un medio glucosa, nitrato de potasio a relación C:N 40:1 la tolerancia térmica de los conidios fue mayor que la de conidios obtenidos a relación C:N 5:1 (Gutiérrez-Rojas et al. 2015).

Se ha encontrado que en otros hongos filamentosos como *Aspergillus nidulans* la trehalosa se acumula en respuesta al choque térmico y oxidativo; y es esencial en la protección contra estos tipos de estrés (Fillinger et al. 2001). Del mismo modo se ha encontrado que el manitol en *A. niger* parece ser esencial para la protección de los conidios contra el daño celular ocasionado por condiciones de estrés térmico y el oxidativo (Ruijter et al. 2003). En hongos entomopatógenos se ha atribuido la adquisición de características de tolerancia a diferentes tipos de estrés, a factores nutricionales durante el crecimiento micelial (Rangel et al. 2015) y también se ha asociado la acumulación de trehalosa, manitol y otros polioles como posibles compuestos protectores contra el estrés presentes en los conidios de estos hongos (Leland et al. 2005). Otro factor asociado a la tolerancia a condiciones de estrés en los conidios de varios Ascomicetes es la presencia de proteínas hidrofobinas en la superficie de la pared (Leland et al. 2005); en los entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus* se encontró una relación entre la termotolerancia de los conidios aéreos y la presencia de proteínas similares a hidrofobinas (Ying & Feng 2004).

Debido a que los factores nutricionales parecen tener un papel en las características de los conidios producidos por diversos hongos filamentosos al igual que en *Penicillium* sp. HC1 y el hecho de que estas características en los conidios de *Penicillium* sp. HC1 puedan cambiar cuando las relación C:N para determinada combinación de una fuente de carbono y nitrógeno usada, pone de manifiesto que es posible que las concentraciones de carbono y la relación C:N también tenga un papel fundamental en la producción y características de los conidios. Por lo tanto el objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la fuente de carbono (C) y nitrógeno (N), la concentración de carbono y la relación C: N en medio líquido, sobre la producción y tolerancia a condiciones de estrés térmico de los conidios de

Penicillium sp. HC1 y determinar si los conidios termotolerantes presentan acumulación de trehalosa, manitol y cambios en la superficie de la pared celular que puedan ser consideradas como variables de calidad asociadas a esta característica.

1. Justificación y planteamiento del problema

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) más de 162 millones de hectáreas (ha) en el mundo fueron destinadas para el cultivo de arroz, en el año 2014 y para ese mismo año se estimó que fueron generados cerca de 9 millones de toneladas de nutrientes contenido en los residuos del cultivo de arroz a nivel mundial, estos residuos de manera directa o indirecta llevaron a la emisión de gases de efecto invernadero como el dióxido de carbono (CO_2) y óxidos de nitrógeno (N_xO) (FAO 2017). El cultivo de arroz es el primero en área sembrada del total de los cultivos transitorios en Colombia según los datos reportados por la Encuesta Nacional Agropecuaria, ENA 2015 (Departamento Administrativo Nacional de Encuesta 2016), y en ese año, 478,878 ha de arroz fueron sembradas en Colombia (Fedearroz 2017).

Del cultivo del arroz, el tamo de arroz es uno de los subproductos más problemáticos de tratar durante la cosecha del cereal. Una de las prácticas más comunes para su manejo es la quema a campo abierto la cual trae nefastas consecuencias ambientales sobre el suelo y la atmosfera por la emisión de CO_2 , monóxido de carbono (CO), metano (CH_4), Óxido nitroso (N_2O) y dióxido de azufre (SO_2) (Uribe-Vélez 2012; Kausar et al. 2010). Otras alternativas para el manejo del tamo consisten en retirarlo para su aprovechamiento o enterrarlo bajo tierra; pero en ambos casos las consecuencias sobre el suelo y la atmosfera son negativas y comparables a los efectos negativos generados por la quema a campo abierto (Uribe-Vélez 2012; Kadam et al. 2000; Abril et al. 2009).

La paja de arroz es un material lignocelulósico típico de la mayoría de los residuos agrícolas, por lo tanto, su principal composición es de polisacáridos como el glucano, xilano y la lignina; su contenido de cenizas en una base de peso seco varía de 13 a 20%; las cenizas generalmente contienen 75% de SiO_2 , 10% de K_2O , 3% de P_2O_5 , 3% de Fe_2O_3 ,

1,3% de CaO y cantidades más pequeñas de Mg, S y Na (Kadam et al. 2000). Los nutrientes contenidos en la paja de arroz que podrían ser reciclados e incorporados nuevamente al cultivo son desaprovechados en la mayoría de los casos; aun así muchos agricultores incurren en gastos para la compra de fertilizantes con el fin de mejorar la calidad de los suelos incrementando los costos de producción y la contaminación de fuentes de agua.

La naturaleza lignocelulósica del tamo de arroz hace de este residuo un material resistente a la descomposición y por lo tanto alternativas como el compostaje suelen ser demoradas y de difícil implementación por parte de los agricultores (Kadam et al. 2000; Uribe-Vélez 2012; Kausar et al. 2010). Los hongos, en especial aquellos denominados de la podredumbre blanca tienen la capacidad de degradar los componentes de la lignocelulosa: lignina, celulosa y hemicelulosa, pero los tiempos de crecimiento de estos hongos son también largos (Kausar et al. 2010). El uso de cultivos mixtos es una alternativa estudiada para la degradación rápida del tamo de arroz o el uso de otros hongos filamentosos de rápido crecimiento, productores de estructuras de propagación como especies de Ascomicetes, entre ellas especies del géneros como *Penicillium* (Kausar et al. 2010).

La alianza Biocultivos S.A y la Universidad Nacional del Colombia a través del IBUN han seleccionado un hongo filamentoso productor de conidios con capacidad celulolítica y xilanolítica para la formulación de un bioinoculante lignocelulósico prospectado para la degradación de residuos agrícolas como el tamo de arroz. Este microorganismo fue denominado *Penicillium* sp HC1 y corresponde a un asilamiento obtenido y caracterizado a partir de un tamizaje de microorganismos asociados a agrosistemas de arroz realizado en 16 fincas entre los Departamento de Tolima y Meta, en el año 2010 por un grupo de investigadores en colaboración de la Universidad Nacional del Colombia y la Pontificia Universidad Javeriana.

La producción industrial de productos biotecnológicos, como se pretende con los conidios de *Penicillium* sp HC1, debe afrontar los retos del escaldo del proceso frente a lo cual la fermentación en fase líquida en condiciones sumergidas presenta mayores ventajas que la fermentación en fase sólida, principalmente por la facilidad en el control de las variables

de producción (temperatura, pH, aireación, entre otras); sin embargo el hecho de que biológicamente los hongos como *Penicillium* se encuentren mejor adaptados a condiciones de crecimiento en soporte sólido como los que brinda el suelo, hace de la producción en fermentación sumergida se conviertan en un reto.

Por otro lado, la producción a gran escala también debe garantizar la viabilidad del microorganismo y la conservación de las características de interés como la secreción de enzimas celulolíticas tal como se espera para *Penicillium* sp HC1. En este caso, debido a que es posible que el bioinoculante se almacene sin cadena de frío o a que en las condiciones de uso en los campos de cultivo de arroz; los conidios presentes en el bioinoculante deban tolerar condiciones medioambientales diferentes a las condiciones óptimas de crecimiento, hace necesario estudiar las condiciones de producción que conlleven a la obtención de conidios no solo viables, sino tolerantes a diferentes tipo de estrés.

Previamente la línea de Investigación de Bioinsumos, del grupo de Bioprocesos y Bioprospección del IBUN, realizó las primeras evaluaciones para la producción en medio líquido a escala de laboratorio de los conidios *Penicillium* sp HC1, y encontró que en medio líquido la fuente de carbono y la interacción de la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno son factores significativos. También se encontró que dependiendo de las condiciones de cultivo los conidios producidos pueden tolerar diversas condiciones de estrés como la exposición a radiación ultravioleta, la presencia de peróxido de hidrogeno y la exposición a tratamientos térmicos de 50°C por una hora y que estas características responden a cambios en la relación C:N.

Se ha encontrado para *Penicillium crysogenum*, *P. grysofulvum* y otras especies de hongos filamentosos que la limitación por carbono y nitrógeno actúan como factores que desencadena la conidiogénesis (Roncal & Ugalde 2003) y en algunas investigaciones se ha mostrado que las características de los conidios cambian en respuesta a la relaciones C:N presentes en el los medios de cultivo; sin embargo, cuando se han evaluado diferentes relaciones C:N en algunas especies de *Penicillium* no se ha evaluado su efecto sobre las características de los conidios. El hecho de que en las investigaciones previas realizadas con *Penicillium* sp HC1 se encontrara que para una determinada combinación de una fuente de carbono con una fuente de nitrógeno en donde se producían conidios

con tolerancia a condiciones de estrés térmico bajas, estas características de tolerancia se pudieran modificar cambiando las relaciones C:N, condujo al planteamiento de la pregunta de investigación del presente trabajo: ¿la limitación por nutrientes, carbono o nitrógeno, en cultivo líquido de *Penicillium sp.* HC1, induce una mayor producción de conidios o influyen en su tolerancia a estrés térmico?

La capacidad de tolerar condiciones de estrés de los conidios se ha relacionado en otros hongos filamentosos como *Aspergillus nidulans* y hongos de interés en control biológico como *Beauveria bassiana*, con las condiciones de cultivo en las que se producen los conidios y con el contenido de trehalosa y manitol que presentes en los conidios tolerantes (Fillinger et al. 2001; Hallsworth & Magan 1994; Gao & Liu 2009); en otros casos la tolerancia a condiciones de estrés de algunos hongos patógenos como *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* y *Penicillium marneffe*, se ha relacionado con cambios en la pigmentación, en la estructura, la arquitectura, y composición de la pared celular (Pihet et al. 2009; Youngchim et al. 2005; Ene, Adya, et al. 2012). Se cree que los conidios de *Penicillium sp.* HC1 que presenten características de tolerancia a estrés térmico puedan presentar una o varias de estas características.

La respuesta a si ¿la limitación por nutrientes, carbono o nitrógeno, en cultivo líquido de *Penicillium sp.* HC1, induce una mayor producción de conidios o influyen en su tolerancia a estrés térmico? Permitirá conocer acerca de los efectos de las de las concentraciones de carbono y la relaciona C:N en la producción y tolerancia térmica de los conidios de *Penicillium sp.* HC. Esto podrá contribuir al desarrollo de estrategias para la mayor producción de conidios con características de tolerancia térmica y estrategia para determinar las características de calidad de los conidios como pueden ser la acumulación de trehalosa, manitol o arreglos en la superficie de la pared.

2.Marco teórico

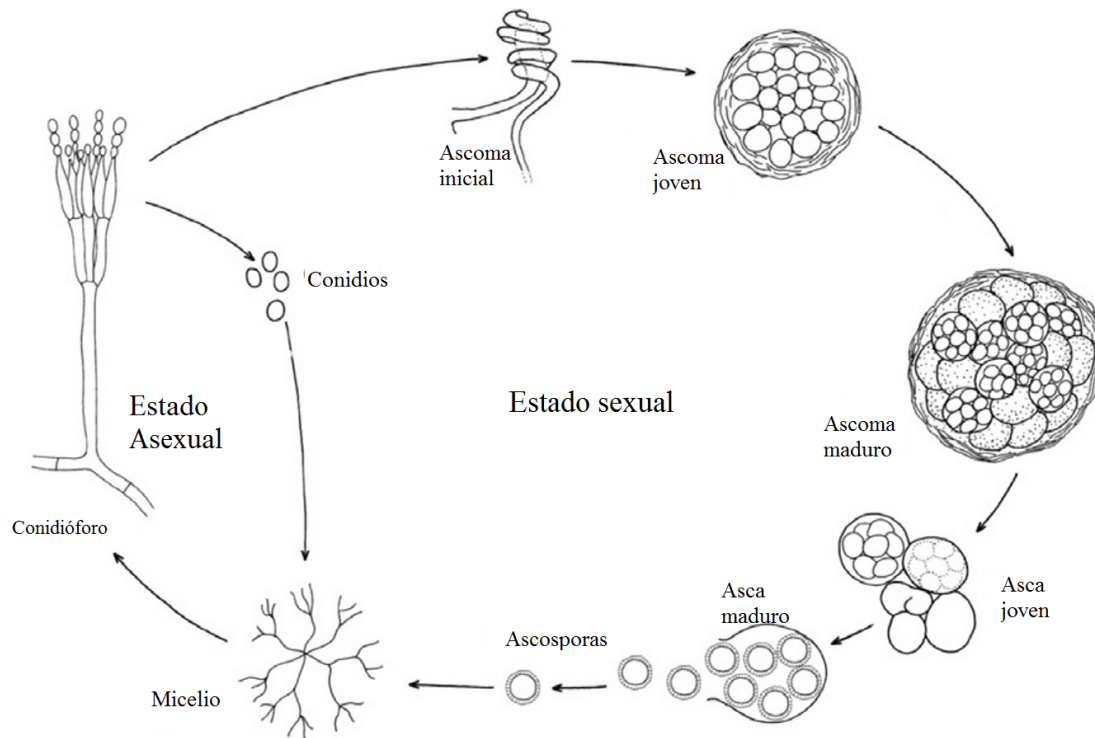
2.1 Generalidades del género *Penicillium*

El género *Penicillium* agrupa diversas especies de hongos filamentosos que pertenecen a los Ascomicetes (Malloch & Cain 1972). Las especies del género son de distribución ubicua y su función principal en la naturaleza es la descomposición de la materia orgánica (Vergara et al. 1936; Stange et al. 2002). Estos organismos son de gran importancia en la medicina, en procesos industriales, la agricultura e investigación biológica (Timberlake & Marshall 1989). El nombre del género fue dado por Link en 1809, su significado es pequeñas brochas o pequeños pinceles y hace analogía a la forma característica en el conidióforo de las especies *Penicillium candidum*, *Penicillium glaucum* y *Penicillium expansum* que observó Link. (Houbraken & Samson 2011). El número de especies dentro del género ha sido controversial debido a que estos organismo muestran una gran plasticidad fenotípica y metabólica (Frisvad 2015). Visagie y colaboradores en 2014 indican la existencia de 350 especies (Visagie et al. 2014).

A la mayoría de las especies del género *Penicillium* no se les conoce su estado teleomorfo, es decir, que solo se conoce su estado de reproducción asexual y se ha clasificado filogenéticamente en la familia de las *Trichocomaceae* (Houbraken & Samson 2011; Wyatt et al. 2013). Sin embargo, se ha demostrado para *P. chrysogenum* una especie reconocida por más de 100 años como anamorfa, que se puede inducir el ciclo de reproducción sexual (Böhm et al. 2013). Cuando el organismo es holomorfo, es decir, que son conocidos sus estados de reproducción sexual y asexual, el ciclo de vida del hongo puede transcurrir entre ambos estados de reproducción, en los cuales la generación de esporas sexuales llamadas ascosporas y esporas asexuales llamadas conidios pueden ser observadas, en

la Figura 2-1 se ilustra el ciclo de vida que incluye el estado sexual y asexual para los hongos pertenecientes a la familia *Trichocomaceae* (Wyatt et al. 2013).

Figura 2-1: Ciclo de vida de los hongos de la familia *Trichocomaceae* (Wyatt et al. 2013).



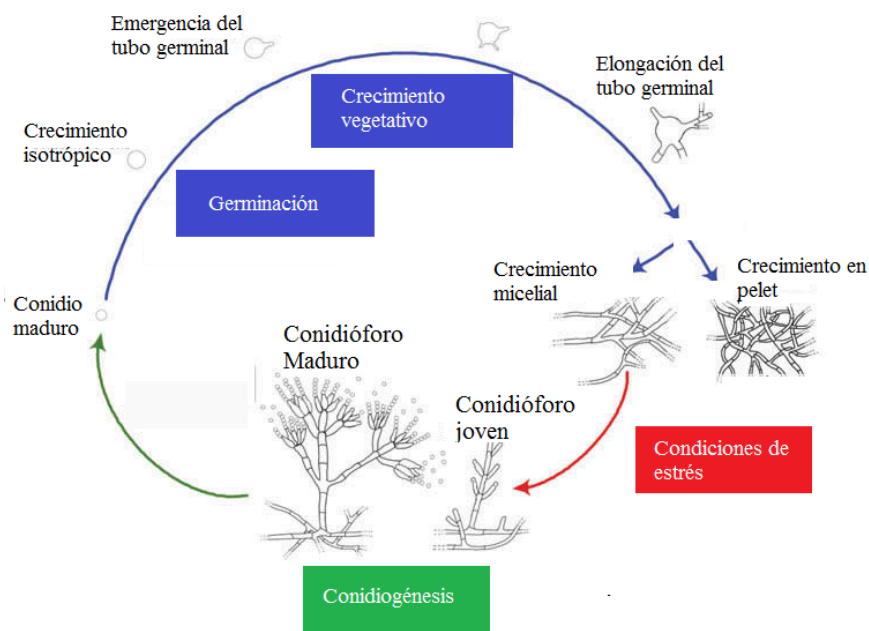
En el estado sexual las esporas originadas aumentan la diversidad genética del hongo posibilitando la adaptación y supervivencia a los posibles ambientes cambiantes (Kim & Hochstrasser 2005). Las esporas sexuales de las *Trichocomaceae* se originan por meiosis dentro de un cuerpo fructificante llamado ascoma o ascomata característico del grupo Ascomiceto al que pertenecen (Wyatt et al. 2013; López-Villavicencio et al. 2010). Este cuerpo fructificante pasa por diferentes estadios de maduración y una vez maduro forma una estructura llamada asca de la cual emergen las ascosporas (Böhm et al. 2013); en especies como *P. chrysogenum* y *P. roquefortii* los ascomas maduros son llamados cleistotecios (Böhm et al. 2013), (Ropars et al. 2014). En el estado asexual, no se aumenta la diversidad genética, el proceso ocurre por división mitótica a través de un proceso denominado conidiogénesis; en este caso las esporas asexuales o conidios son generados para una mayor dispersión y la conquista de nuevos nichos (Kim & Hochstrasser 2005; Park & Yu 2012).

El ciclo de vida asexual para el género *Penicillium* será descrito en detalle en los siguientes numerales ya que varias etapas del ciclo son de interés para esta investigación.

2.2 Ciclo de vida asexual del género *Penicillium*

Canteri y Ghoul resumen el ciclo de vida, en estado de reproducción asexual, de los *Penicillium* en cuatro fases que se ilustran en la Figura 2-2. Fase de adaptación: los conidios reconocen y se adaptan a las nuevas condiciones fisicoquímicas ambientales; fase de crecimiento exponencial o germinación: hay un aumento significativo de la masa celular de los conidios, los cuales presentan un crecimiento isotrópico y germinan originando una estructura filamentosa llamada hifa; fase estacionaria o de crecimiento vegetativo: existe un equilibrio entre el aumento y la disminución de la masa micelial y fase de conidiogénesis: en la que nuevos conidios son generados a partir de una estructura característica llamada conidióforo por una célula especializada llamada fiálide (Canteri & Ghoul 2015).

Figura 2-2: Ciclo de vida asexual de *Penicillium* sp. (Canteri & Ghoul 2015).



En la mayoría de hongos filamentosos, las etapas del ciclo de vida en el estado asexual involucran muchos factores, asociados a la regulación temporo-espacial de la expresión de genes, la diferenciación celular, la comunicación intra e intercelular y la respuesta a condiciones ambientales. En este sentido se ha encontrado que diversos factores como la

luz, variaciones en la fuente de carbono y condiciones de estrés oxidativo u osmótico entre otros, promueven receptores y reguladores celulares que condicionan la respuesta celular hacia uno u otro estado del ciclo de vida del hongo (Park & Yu 2012; H.-S. Park and J.-H. Yu et al. 2016).

A continuación se describen los factores que afectan las etapas de germinación, crecimiento vegetativo y conidiogénesis en el ciclo de vida asexual de los *Penicillium*

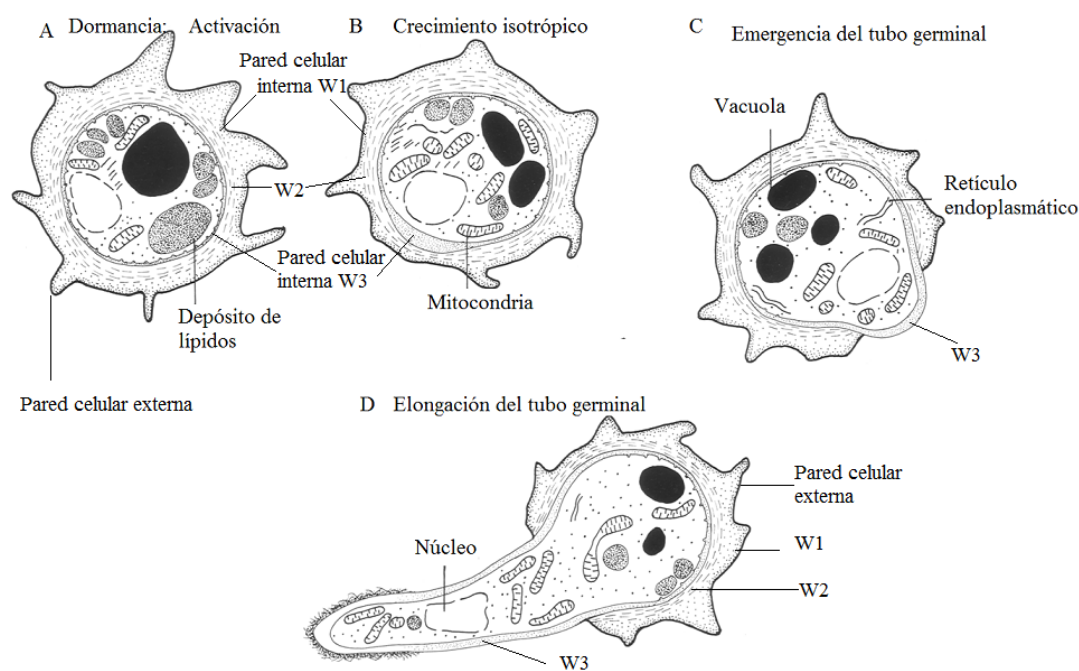
2.2.1 Germinación

Antes del proceso de germinación los conidios se encuentran en estado de dormancia, una importante estrategia que ha sido desarrollada por muchos hongos filamentosos para sobrevivir por largos periodos de tiempo en condiciones caracterizadas por la presencia de una situación externa no favorable (Wyatt et al. 2013) . El conidio en estado de dormancia contiene una menor cantidad de agua que las células vegetativas y se encuentra inactivo metabólicamente (Feofilova et al. 2012). El proceso de germinación en hongos se ha definido como la transformación de una espora inactiva o en estado de dormancia en un talo vegetativo altamente activo; este proceso se caracteriza por la adsorción de agua, por un incremento en la respiración, cambios en la actividad enzimática y la biosíntesis de muchos componentes celulares dentro del conidio (Martín & Nicolás 1970). Wendlan, indica que la germinación del conidio, es un proceso secuencial que lleva cuatro etapas principales: etapa de activación o disrupción del estado de dormancia, etapa de crecimiento isotrópico, etapa de establecimiento de un crecimiento polarizado y etapa de elongación del tubo germinativo (Wendland 2001)

En la Figura 2-3 se muestran los cambios morfológicos que Remsen y colaboradores esquematizaron a partir de las observaciones realizadas por microscopía electrónica a cortes ultra estructurales de conidios de *Penicillium megasporium* durante el proceso de germinación. En el conidio en estado de dominancia (Figura 2-3 esquema A) se observan mitocondrias, vacuolas y depósitos lipídicos. Antes de la aparición del tubo germinal (Figura 2-3 esquema B y C), en el estado de crecimiento isotrópico, ocurre un aumento en el número de mitocondrias y vacuolas así como una disminución en los depósitos lipídicos y la aparición de compartimentos importantes en la síntesis de proteínas como el retículo endoplásmico; en este momento ocurren cambios en las capas internas de la pared celular

que consisten principalmente en un engrosamiento de la pared más interna (W3). La elongación del tubo germinal (Figura 2-3 esquema D), ocurre a partir del punto de engrosamiento de la capa más interna de la pared celular (W3) que se extiende alrededor de todo el tubo germinal, en la parte más apical del tubo germinal se acumula material electrodenso y su pared es más similar a la de la hifa; simultáneamente ocurre la reorganización de los organelos celulares; el núcleo celular se dispone hacia el extremo apical del tubo germinal (Remsen et al. 1967; Wendland 2001).

Figura 2-3: Esquema de los cambios morfológicos de *Penicillium megasporum* en proceso de germinación (Remsen et al. 1967).



Como producto de la actividad metabólica durante el proceso de germinación, aumenta la concentración de nitrógeno, proteínas y ácidos nucleicos a la vez que disminuye el contenido de lípidos totales e hidratos de carbono (Martin et al. 1974). El crecimiento isotrópico y la subsecuente germinación del conidio son solo posibles en presencia de los adecuados estímulos exógenos producidos principalmente por la presencia de la fuente de carbono y nitrógeno. Martin y colaboradores, encontraron que el total de los conidios de *Penicillium notatum* observados a las 36 horas de cultivo germinaron cuando la sacarosa o la glucosa fueron usadas como fuente de carbono y sales de amonio, nitrato de sodio e hidrolizados de caseínas fueron usados como fuentes de nitrógeno; la germinación no fue

dependiente de factores de crecimientos ni vitaminas y ocurrió a un pH óptimo de 6 (Martin et al. 1973). Sin embargo, los requerimiento del tipo de fuente de carbono o fuente de nitrógeno puede ser específicos de cada especie y no podrían hacerse generalizaciones, ya que para conidios de *Penicillium griseofulvum* fue encontrado un requerimiento absoluto de glucosa para iniciar la germinación (Fletcher & Morton 1970).

La germinación es inhibida cuando hay conidios en alta densidad, y se ha relacionado con la presencia de compuestos volátiles como el 1-octeno-3-ol. En *P. paneum*, se cree que este compuesto actúa como auto inhibidor de la germinación para evitar la prematura germinación de los conidios después de la formación y antes de la dispersión (Chitarra et al. 2004).

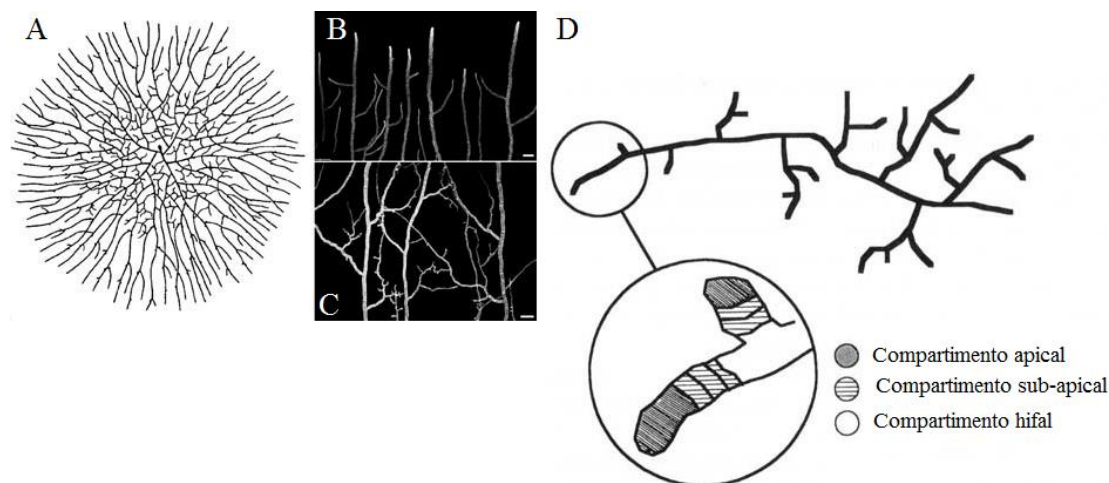
2.2.2 Crecimiento vegetativo

Como saprofitos, los sustratos sobre los que naturalmente crecen los *Penicillium* y otros hongos filamentosos son matrices orgánicas que se encuentran en estado sólido o semisólido (Wang et al. 2015). Debido al interés industrial que tienen muchas especies de estos hongos, entre ellas especies del genero *Penicillium* y *Aspergillus*, se ha estudiado desde ya hace varias décadas su capacidad de crecimiento en medio líquido (McIntyre et al. 2001). Estrategias industriales para el aprovechamiento de estos organismos han llevado al desarrollo y optimización de procesos de cultivo o fermentación en fase solida (FS) o en fase sumergida (FmS); en ambos casos, tras el proceso de germinación el crecimiento vegetativo lleva a la formación de una estructura tubular filamentosa, multinucleada denominada hifa (Timberlake & Marshall 1989).

La hifa que crece en la superficie de una matriz sólida, se extiende por diferentes vías llevando a la aparición de una colonia con apariencia y organización microscópica como se muestra en la Figura 2-4 (esquema A). En el borde más avanzado, el crecimiento de extensión apical es dominante, existen pocas ramificaciones, no hay anastomosis y se ubican hacia la periferia de la colonia (Figura 2-4, microfotografía B). Zonas de mayor edad muestran ramificaciones laterales sub-apicales, las cuales se fusionan por anastomosis con hifas ya existentes, o entre ellas mismas (Figura 2-4, microfotografía C). En la punta de una hifa, se distinguen tres tipos de compartimientos, regiones o zonas de crecimiento: apical, sub-apical y la hifa propiamente dicha (Figura 2-4, panel D). Todo el crecimiento de

la hifa lleva a la formación de una estructura compleja que funciona como un solo cuerpo y que posee diferencias fisiológicas importantes para la colonia (Ugalde 2006).

Figura 2-4: Modelo de la estructura morfológica para el crecimiento de hongos filamentosos en cultivo sólido¹(Nielsen 1993; Ugalde 2006).



La morfología, pigmentación y secreción de metabolitos secundarios en las colonias de *Penicillium* son dependientes de la composición y condiciones del medio de cultivo en fase sólida. Estas características son especie específicas y han sido usadas para la clasificación de especies del género a escala de laboratorio (Frisvad & Samson 2004). A escala industrial, también se ha observado que la morfología y productividad de diversos hongos en matrices solidas depende de parámetros críticos como la especie, la aireación, la actividad del agua, parámetros físicos, como el pH y la temperatura y la composición del medio (De Carvalho 2016).

En fermentación sumergida las características morfológicas de los hongos filamentosos puede variar de micelial a agregados esféricos o esferoides llamados pellets² (Krull et al.

¹ A: Ilustración del patrón típico de una colonia resultante de una única espора germinada. B: Imagen confocal de la colonia que muestras la organización de las hifas en la región periférica. C: Imagen confocal de la colonia que muestras la organización de las hifas en la región distal. D: Ilustración de la estructura de una hifa densamente ramificada. La ampliación de la sección de la punta muestra la división la hifa en tres compartimentos: apical, sub-apical, y compartimiento de la hifa.

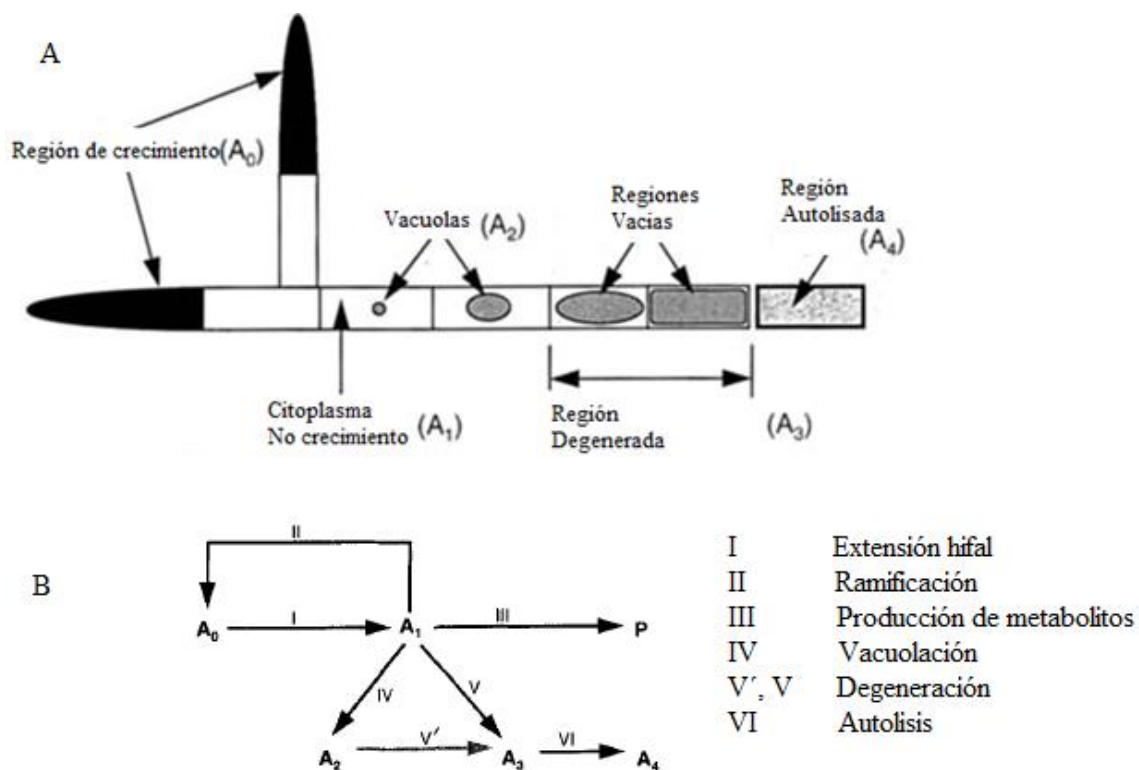
² En adelante se usará el término pellet para hacer referencia a la forma de crecimiento en agregados esferoides en medio líquido.

2013). Parámetros como la composición del medio, el pH, la temperatura, la agitación, la tensión de oxígeno, agentes surfactantes, la viscosidad del medio o la concentración de inóculo; determinan uno u otro estado morfológico. Respecto a la composición del medio de cultivo y el número de conidios germinados, Camici y colaboradores, encontraron que cuando el número de conidios germinados es alto en relación a la capacidad de soporte de crecimiento del medio de cultivo, el crecimiento de la hifa toma lugar en una dirección principalmente y el número de ramificaciones es reducido, por lo tanto las colonias individuales consisten solamente en filamentos de hifas largos. El resultado de la aglomeración conjunta de estas hifas semeja a una red de micelio que representa el crecimiento de tipo filamentoso o micelial. Por otro lado, si un número relativamente pequeño de conidios germinados crece libremente en un medio de cultivo rico, cada uno podría llevar al desarrollo independiente de una colonia, la cual crecería de forma radial en todas las direcciones resultando finalmente en pequeñas bolas globulares o pellets (Camici et al. 1952).

En el caso del crecimiento filamentoso o micelial en fermentación sumergida, Paul y Thomas, propusieron un modelo que describe regiones características observadas en las hifas de *P. chrysogenum* y su asociación con la producción de penicilina. Su modelo indica que la hifa puede ser dividida en cuatro regiones distintivas basados en la actividad y estructura de las células: Existe una región activa de crecimiento principalmente apical denominada A_0 , la región A_1 que no presenta crecimiento citoplasmático, en las regiones de no crecimiento se presentan pequeñas vacuolas A_2 y regiones degeneradas o metabólicamente inactivas son identificadas como A_3 ; en la región A_4 se presenta autólisis. Las etapas a través de las cuales ocurre cada transición entre estas regiones también fueron propuestas en el modelo de Paul y Thomas, en la etapa (I) de extensión de la hifa o crecimiento apical un región en A_0 pasa a A_1 , en la etapa de ramificación (II) una región en A_1 pasa a A_0 ; la producción de penicilina (III) o excreción de metabolitos secundarios se asocian a regiones A_1 ; la vacuolización (IV) ocurre en regiones A_1 que pasan a A_2 y se asocia a limitaciones en la disponibilidad de nutrientes, ya que altas concentraciones de sustrato inhiben este proceso; mientras que la degeneración (V) puede ocurrir a partir de regiones A_1 que pasan a A_3 o A_2 que pasan a A_3 , la cual ocurre por la presencia de vacuolas de gran tamaño; finalmente las regiones A_3 pasan a A_4 donde ocurre la autólisis (VI) que se da en aquellas regiones fuertemente vacuoladas ya sea por reacciones enzimáticas o

por fragmentación por fuerzas mecánicas como la agitación. En la Figura 2-5 se muestra el diagrama esquemático de las regiones características en una hifa y el ciclo para el mecanismo de extensión, ramificación, vacuolización, autólisis y producción de metabolitos del *P. chrysogenum* (Paul & Thomas 1996).

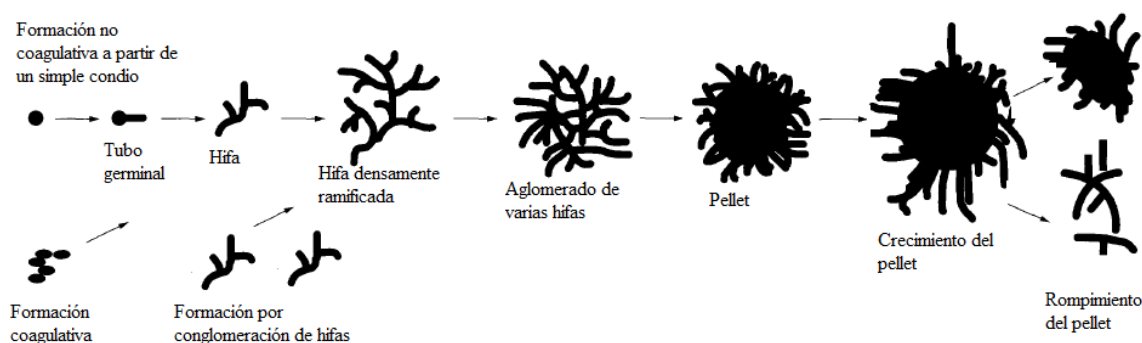
Figura 2-5: Modelo de la estructura morfológica para el crecimiento de *Penicillium chrysogenum* en cultivo sumergido (Paul & Thomas 1996) .



Por otro lado, en el caso de la morfología de crecimiento en forma de pellet en fermentación sumergida, Jens Nielsen propuso un modelo en el que describe las etapas de formación de este tipo de conglomerados y los cambios en la morfología por los que pueden pasar los pellets, los cuales son ilustrados en la Figura 2-6. Nielsen, indica que la formación del pellet depende de la especie y que un pellet se puede formar por tres vías: a partir de un conidio simple denominada formación no coagulativa, por agregados de conidios denominada formación coagulativa o por la conglomeración de hifas individuales; el tipo de formación de pellet para la especie *Penicillium chrysogenum* es por conglomeración de hifas. Con relación al crecimiento del pellet, Nielsen, encontró que no es exponencial y que

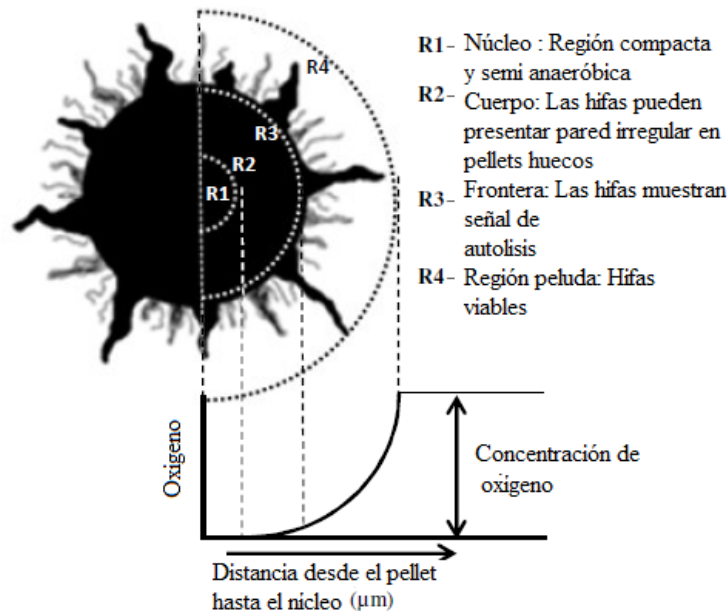
el tamaño en un mismo medio puede variar entre cientos de micrómetros a varios milímetros; la forma del pellet puede variar por las fuerzas hidrodinámicas que actúan sobre él, lo que puede conducir a la fragmentación de las hifas en la superficie de pellet y por lo tanto afectar el tamaño; este mecanismo se denomina erosión de pellet y tiene muchas similitudes con la fragmentación de hifas elementales. Además de la erosión de los pellets, puede haber una desintegración completa de los gránulos; la explicación que Nielsen propone a este fenómeno es por la limitación en la transferencia de masa en el centro del gránulo, lo que conduce a una zona de no generación de energía que eventualmente lleva a la lisis de las hifas que no crecen y que conducen a la desestabilización del pellet (Nielsen 1996).

Figura 2-6: Morfología macroscópica del pellet (Nielsen 1996).



El pellet posee características metabólicas diferentes, según Espinosa-Ortiz y colaboradores, cuatro regiones pueden ser reconocidas en el pellet, la primera región, R1 corresponde a un núcleo compacto el cual presenta un ambiente semi-anaeróbico con muy poca cantidad de hifas viables. La segunda región o R2 corresponde a una capa alrededor de la región central donde las hifas presentan una estructura de la pared irregular. Aparece una tercera región R3 en pellets huecos, con hifas que muestran signos claros de autólisis, y la cuarta región R4 correspondiente a la zona peluda externa, las hifas en esta región son viables y metabólicamente más activas que en las otras regiones. En la figura 2-7 se muestra como se encuentran ubicadas estas regiones en un pellet completo y cómo cambia la concentración de oxígeno en relación a la distancia a partir del núcleo del pellet (Espinosa-Ortiz et al. 2016).

Figura 2-7: Regiones identificables en un pellet fúngico y gradiente de oxígeno dentro del pellet. (Espinosa-Ortiz et al. 2016).

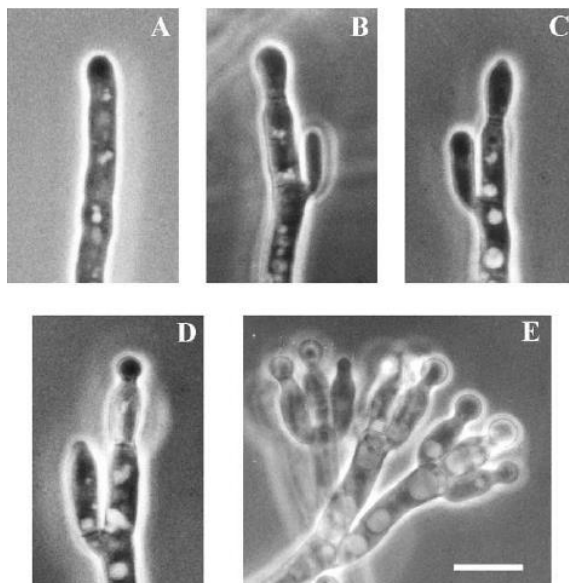


2.2.3 Conidiogénesis

En estado de reproducción asexual, la conidiogénesis inicia cuando una hifa vegetativa censa un estímulo ambiental que promueve la diferenciación celular y lleva a la formación de un célula especializada denominada fiálide a partir de la cual emergen los nuevos conidios (Roncal & Ugalde 2003). Este tipo de conidiogénesis se denomina enteroblástica y fue descrito para *Penicillium corylophilum* por Dierckx en 1901 (Cole & Kendrick 1969). En la Figura 2-8 se muestran los principales estados morfológicos de *Penicillium cyclopium* durante el proceso de conidiogénesis inducido y sincronizado con iones de calcio, en medio de cultivo líquido descritos por Roncal y Ugalde. En la fase de inducción el crecimiento apical de la hifa vegetativa cesa, Figura 2-8 (microfotografía A); en la fase de agrandamiento la célula apical aumenta de tamaño y es delimitada por un septo con la concomitante formación de ramificaciones subapicales, Figura 2-8 (microfotografía B); en la fase de diferenciación la célula apical se especializa en fiálide, Figura 2-8 (microfotografía C); en la fase de conidiación del ápice de la fiálide emerge un primer conidio, Figura 2-8 (microfotografía D). Al finalizar el proceso una cadena de conidios emergen de una fiálide y nuevas fiálides han aparecido, originando el conidióforo

característico del género en forma de pequeños pinceles (Figura 2-8 E) (Roncal & Ugalde 2003).

Figura 2-8: Estados morfológicos de *Penicillium cyclopium* durante el proceso de conidiogénesis en medio de cultivo líquido ³(Roncal & Ugalde 2003).

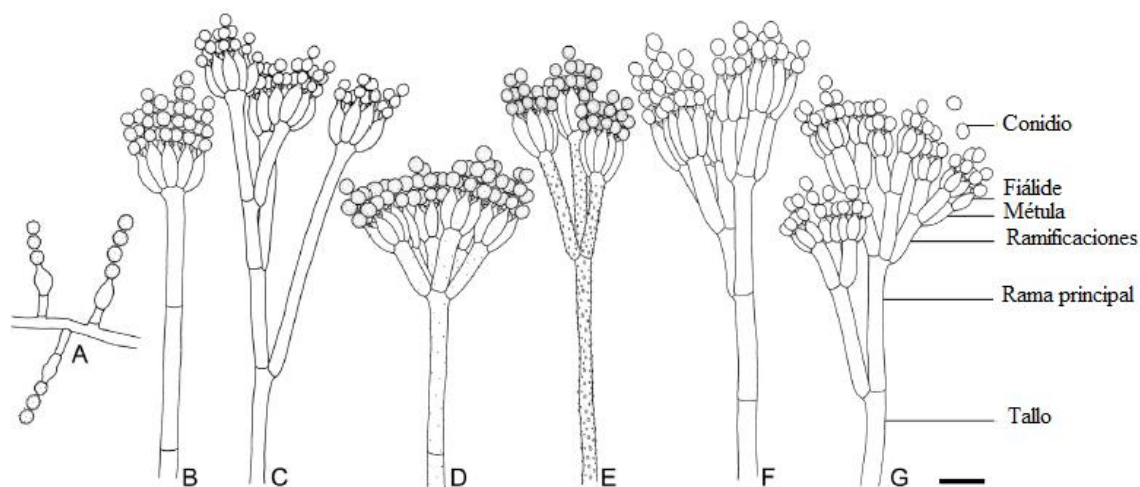


Los conidióforos son de gran importancia taxonómica y dependiendo de la especie y el tiempo de cultivo la micromorfología de estos puede cambiar, desde ser simples fiálides solitarias hasta patrones muy complejos con múltiples niveles de ramificación que resultan en patrones globales simétricos o asimétricos como se muestra en la Figura 2-9. (Visagie et al. 2014). Visagie y colaboradores hacen una descripción de los diferentes tipos de conidióforos de *Penicillium*, los que pueden corresponder a simples las fiálides solitarias (Figura 2-9 A); conidióforos monoverticilados que poseen una solo tallo septado que termina en un agrupamiento de fiálides (Figura 2-9 B); conidióforos diverticilados que tienen un patrón de ramificación que va de simple a complejo con numerosas ramas subterminales, pero las ramificaciones o partes del conidióforo son divergentes (Figura 2-9 C); conidióforos biverticilados que tienen un tallo septado de tres o más métulas que son las células que soportan las fiálides y se ubican desde el extremo final del tallo hasta la

³ (A) Etapa 1: hifa vegetativa. (B) Etapa 2: Hinchazón de la célula apical y ramificación sub-apical. (C) Etapa 3: formación de la fiálide. (D) Etapa 4: formación de conidios. Barra de escala = 10 μ m

base de la fiálide, las métulas pueden ser de longitud desigual o igual, variar en su grado de divergencia y son usualmente más o menos cilíndricas pero también pueden ser lisas o ligeramente vesiculosas (Figura 2-9 D, E); conidióforos terverticilados que tienen otro nivel de ramificación entre el tallo y las métulas (Figura 2-9 F); y los conidióforos cuaterverticilados que son producidos por sólo unas pocas especies, y tienen un nivel extra de ramificación más allá del patrón terverticilados (Figura 2-9 G) (Visagie et al. 2014).

Figura 2-9: Tipos de conidióforos de los *Penicillium*⁴ (Visagie et al. 2014).



2.2.4 Conidiogénesis microcíclica

Varias especies de hongos entre ellas especies de *Penicillium*, tienen un ciclo de vida asexual extremadamente simplificado cuando se someten a condiciones de estrés, en los cuales los conidios germinan y generan directamente conidióforos y nuevos conidios sin formar micelio, este fenómeno se ha definido como conidiogénesis microcíclica o conidiación microcíclica (Jung et al. 2014) .

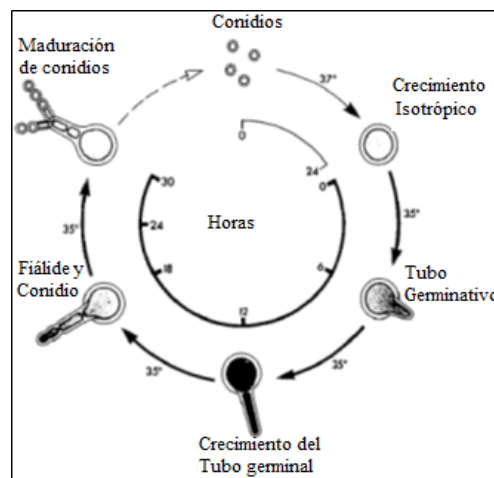
La conidiogénesis microcíclica puede ser inducida por diferentes factores, entre ellos temperaturas diferentes a la óptima de crecimiento, el pH, limitación por nutrientes como la glucosa, rápida incorporación de amonio o glutamato (Pazout & Schröder 1988),

⁴ A. Conidióforos con fiálides solitarias. B. Monoverticilado. C. Diverticilado. D, E. Biverticilado. F. Terverticilado. G. Cuaterverticilado. Barra de escala = 10 µm.

Sekiguchi y colaboradores, lograron sincronizar el proceso de conidiogénesis microcíclica para *Penicillium urticae* en medio de cultivo líquido, cambiando la temperatura de incubación durante el proceso de germinación y limitando la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo; los conidios inoculados fueron incubados a 37°C hasta el crecimiento isotrópico durante 24 horas, tiempo después del cual fue bajada a 35°C y el medio fue cambiado, a la hora 30 el conidio germinado había formado un conidióforo del que se desprendían nuevos conidios maduros; los cambios morfológicos presentados durante el proceso se ilustran en la Figura 2-10 (Sekiguchi et al. 1975). En 2014, Boualem y colaboradores, lograron producir conidios de *Penicillium camemberti* en medio líquido induciendo conidiogénesis microcíclica a temperaturas de 18 y 30 °C (Boualem et al. 2014a).

Aunque se desconocen los detalles de los mecanismos que controlan la conidiogénesis microcíclica, García-Rico y colaboradores encontraron en *Penicillium chrysogenum* que la subunidad alfa de receptores de membrana de proteína G heterotrimérica (Pga1) parecen estar implicadas en la regulación negativa de este proceso. Cuando los conidios de mutantes de *Penicillium chrysogenum* que expresaban Pga1 inactiva crecían en medios de cultivos líquidos desarrollaban conidiogénesis microcíclica y sobre expresaban genes relacionados con la conidiogénesis (García-Rico et al. 2008).

Figura 2-10: Cambios morfológicos durante la conidiogénesis microcíclica de *P. urticae*. (Sekiguchi et al. 1975).



2.2.5 Factores que promueven la conidiogénesis

La conidiogénesis es una etapa en el ciclo de vida de los hongos filamentosos que es controlada por múltiples factores medioambientales (Roncal & Ugalde 2003). A continuación se mencionan los factores más estudiados en *Penicillium* relacionados con la inducción de la conidiogénesis en cultivo sumergido, entre ellas la adición de calcio, la acumulación de metabolitos secundarios como la conidiogenona, la fuente de nitrógeno y la fuente de carbono.

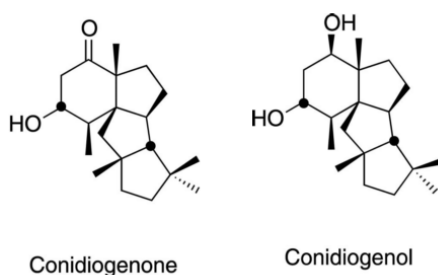
Adición de calcio

El calcio es un catión, dentro de las células actúa como segundo mensajero, es decir, que activa factores de transcripción que prenden y apagan genes (Boyle 2005). La adición de calcio como una forma de lograr la diferenciación sincrónica de hifas en un micelio o pellet en fase vegetativa en cultivos sumergidos de *Penicillium notatum* fue establecida por Pitt y Poole en 1981, y según ellos, este proceso se logra antes de que cualquier nutriente importante en el medio este limitado (Pitt & Poole 1981). Cuando Pitt y Mosley en 1986 examinaron el efecto de la adición del calcio sobre la conidiogénesis y su relación con el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) en *Penicillium notatum*, encontraron que la conidiogénesis de *P. notatum* puede ocurrir en presencia de ciertos intermediarios del TCA, algunos aminoácidos o glicerol, en ausencia de calcio; lo que sugiere que el mecanismo por el cual el calcio induce la conidiogénesis se encuentra asociado a disrupción de múltiples rutas en la glicólisis, el catabolismo de los carbohidratos y la función mitocondrial, que lleva a un desbalance en la obtención de energía y desencadena el proceso (Pitt & Mosley 1986). En cultivos sumergidos de *Penicillium camemberti*, en un medio con glucosa como fuente de carbono y acetato o cloruro de amonio como fuente de nitrógeno, la adición de cloruro de calcio (CaCl_2) fue necesaria para detener el crecimiento micelial e inducir la conidiogénesis antes de las 100 horas de cultivo y en las condiciones evaluadas una concentración de 14.3mM indujo la mayor concentración de conidios por ml correspondiente a 1.6×10^8 (Bockelmann et al. 1999). Hoy en día algunos medios formulados para el crecimiento y estudio de la conidiogénesis en cultivo sumergido de *P. camemberti* contienen cloruro de calcio (Boualem et al. 2014b).

Acumulación de conidiogenona y conidiogenol

La conidiogenona ($C_{20}H_{32}O_2$) y el conidiogenol ($C_{20}H_{34}O_2$), corresponden a compuestos diterpenos tetracíclicos de la clase ciclopiana (Cordobe et al. 2002; Hou et al. 2016). La estructura química es mostrada en la Figura 2-11, las moléculas están conformadas por esqueletos de hidrocarburos tetracíclicos que contienen sólo dos grupos funcionales: dos hidroxilos en conidiogenol y uno de ellos oxidado a un grupo cetona en la conidiogenona (Cordobe et al. 2002).

Figura 2-11: Estructura química de la conidiogenona y el conidiogenol (Cordobe et al. 2002).



Estos compuestos fueron aislados y caracterizados por Cordobe y colaboradores, en 2002 cuando estudiaban el proceso de conidiogénesis de *Penicillium cyclopium*. Ellos encontraron que la conidiogénesis ocurría aceleradamente en medios de cultivos que previamente habían soportado el crecimiento del hongo y atribuyeron este efecto a la presencia de estos dos metabolitos secundarios, además encontraron que la presencia del calcio disminuye la concentración umbral de conidiogenona requerida para inducir la formación de conidios y que el conidiogenol aunque tiene el mismo efecto inductor de la conidiogénesis presenta un efecto retardado, lo que sugiere que sea un precursor o inhibidor de la conidiogenona. La conidiogenona también induce la conidiogénesis microcíclica (Cordobe et al. 2002).

Roncal y Ugalde, sugieren que el mecanismo por el cual la conidiogenona podría inducir la conidiogénesis sea similar a los de *quorum sensing* encontrados en algunos procariontes y según los cuales las células sintetizan moléculas autoinductoras o autorreguladoras que, al acumularse más allá de un umbral, dirigen varias respuestas celulares a través de la activación de programas genéticos alternativos (Roncal & Ugalde 2003).

Fuente de nitrógeno y limitación por nitrógeno

El nitrógeno es un nutriente esencial para el crecimiento de los hongos, los cuales se han adaptado para metabolizar diferentes fuentes según su disponibilidad en el medio ambiente (Tudzynski 2014). Las fuentes de nitrógeno más utilizadas en el cultivo de *Penicillium* son sales de amonio, nitratos o compuestos orgánicos, como aminoácidos o proteínas, también se usan materias primas industriales, ricas en nitrógeno como mezclas de remolacha o de caña de azúcar, licor de maíz, suero en polvo, harina de soja, extracto de levadura entre otros (Canteri & Ghoul 2015; Papagianni 2004).

La limitación del nitrógeno puede desencadenar la conidiogénesis. Morton en 1961, publicó uno de los primeros estudios sobre el efecto del nitrógeno en la conidiogénesis de dos especies de *Penicillium*: *P. griseofulvum* y *P. chrysogenum* y encontrando que en condiciones de cultivo sumergido, cuando el micelio se encuentra en un medio que contiene una alta concentración de glucosa, pero sin nitrógeno asimilable, el proceso de conidiogénesis ocurre rápidamente (Morton 1961).

Así mismo, el tipo de fuente de nitrógeno afecta la conidiogénesis. Krasniewski y colaboradores en 2006, evaluaron diferentes fuentes de nitrógeno en medio sólido y su efecto en la conidiogénesis de *Penicillium camemberti*, y observaron que no hay conidiogénesis cuando utilizaron sulfato de amonio o nitrato de sodio como fuentes de nitrógeno mientras que, la conidiogénesis aumentó significativamente en presencia de fosfato de amonio o nitrato de potasio; al limitar la concentración de nitrato de potasio aumento también índice de esporulación (Krasniewski et al. 2006).

En condiciones de cultivo sumergido, Boualem y colaboradores en 2016, encontraron que la conidiogénesis de *Penicillium camemberti* se afecta por el tipo de fuente de nitrógeno; en medios complejos que contienen extracto de carne como fuente de nitrógeno, los extremos de las hifas no se diferenciaron en fiálides y por lo tanto no produjeron conidios después de 6 días de incubación a 25°C, por el contrario, en un medio sintético que contiene nitrato de potasio (KNO_3) como única fuente de nitrógeno, los extremos de las hifas se diferencian en fiálides produciendo 5×10^6 conidios/ ml (Boualem et al. 2016).

Fuente de carbono y limitación por carbono

Como heterótrofos los *Penicillium* requieren compuestos orgánicos como fuentes de carbono y energía. Los polisacáridos, aminoácidos, lípidos, ácidos orgánicos, proteínas, alcoholes e hidrocarburos pueden ser usados por *Penicillium* como fuentes de carbono. Sin embargo, la D-glucosa, la D-fructosa, la sacarosa, la melaza y el extracto de maíz son las fuentes de carbono preferidas para los cultivos de *Penicillium* en el campo industrial (Canteri & Ghoul 2015).

La concentración y tipo de fuente de carbono pueden afectar la conidiogénesis. Bockelmann y colaboradores en 1999, encontraron para *Penicillium camemberti* en fermentación sumergida, que al comparar concentraciones de 10g /L y 30g /L de glucosa, a concentraciones de 10g /L el proceso de conidiogénesis de *Penicillium camemberti* tuvo una mayor presencia y diferenciación de conidióforos así como un mayor número de conidios a las 48 horas (Bockelmann et al. 1999).

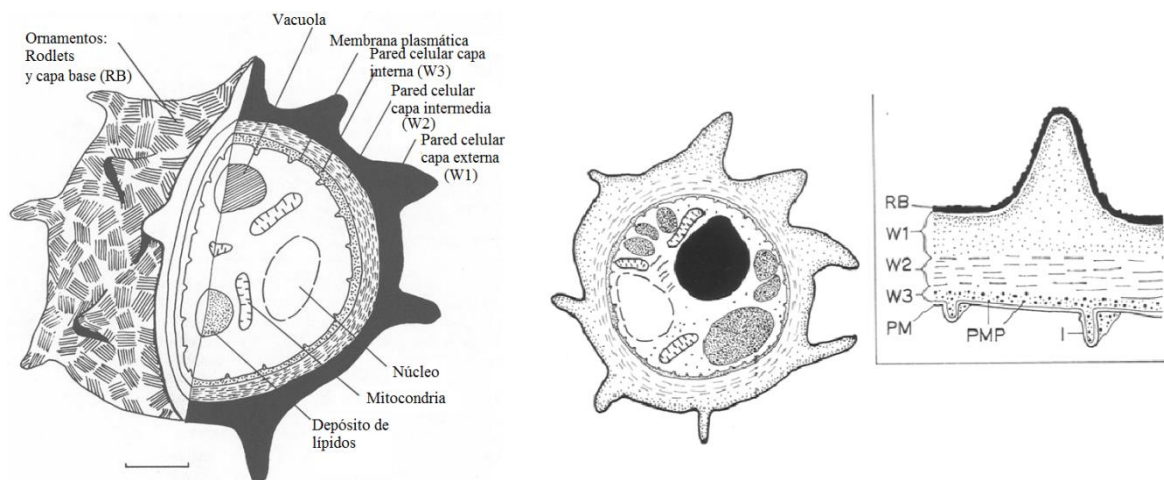
2.3 Características de los conidios del género *Penicillium*

Los conidios de *Penicillium* spp., son esporas asexuales inmóviles, metabólicamente inactivas generadas por mitosis de una célula especializada denominada fiálide. Los conidios son propágulos dispersivos con bajo contenido de agua y un complejo de pared celular de capas múltiples, claramente diferente de la hifa vegetativa (Oier Etxebeste, 2010).

2.3.1 Organización de la pared celular, rodlets y ornamentos

La pared celular de los hongos y su composición química, en particular, es probablemente un factor importante en el mantenimiento del estado de latencia de los conidios (Feofilova et al. 2012). La pared celular es una estructura dinámica que está cambiando continuamente, estos cambios son consecuencia de las modificaciones de las condiciones del cultivo y las condiciones de estrés ambiental a la que es sometido el hongo (Latgé, 2007). En la figura 2-12, se ilustra la organización de la célula de un conidio de *Penicillium megasporium* y las múltiples capas de la pared celular, la capa más externa de la pared soporta los ornamentos característicos de cada especie.

Figura 2-12: Ilustración de la morfología de un conidio de *Penicillium megasporium*, su organización interna y pared celular con múltiples capas (Moss 1987) y (Remsen et al. 1967).



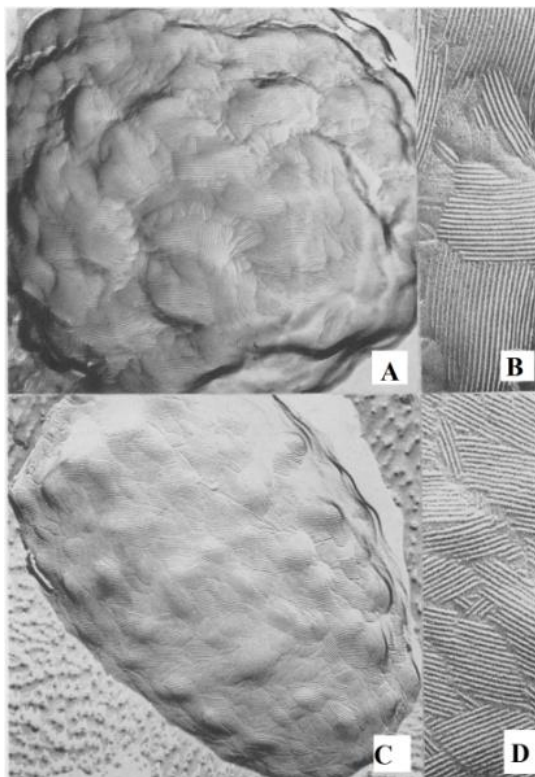
La superficie de la pared celular de los conidios de diversas especies de *Penicillium* están cubiertas por arreglos similares a varillas o cilindros denominados rodlets⁵ que se disponen de manera diferencial para cada especie (Hess, Sassen, & Remsen, 1968). En la Figura 2-13 es mostrada la superficie donde se observan la disposición de los rodlets en un conidio de *Penicillium digitatum*; su forma y superficie es diferente a la de otra especie de mismo género *Penicillium herquei*.

Los rodlets están formados por la polimerización de proteínas hidrofóbicas, que le confieren resistencia a las condiciones de estrés, se pueden observar cambios en los arreglos de los rodlets asociados a cambios en la pigmentación típica del hongo en agar YPDA a los 5 días en el patógeno *Aspergillus fumigatus* (Pihet et al., 2009). Al cambiar la fuente de carbono, cambia la arquitectura de la pared y el espesor de los componentes quitina, glucano y manano, en la levadura *Candida albicans*. Además se observó para este patógeno que estos cambios se asocian con respuestas diferenciales al estrés osmótico (Ene, Adya, et al. 2012). Aun así, las especies parecen tener un patrón de ornamentación característico (Martinez et al. 1982). Martínez y colaboradores en 1982, caracterizaron 211 especies del género *Penicillium* y las clasificaron en seis tipos según los ornamentos

⁵ El termino *rodlets* será usado en el texto para hacer referencia a los patrones de organización de las proteínas hidrofobinas presentes en la superficie de la pared de los conidios de *Penicillium* y otros hongos filamentosos.

presentes en la superficie de la pared de los conidios. En la Tabla 2-1 son mostrados los tipos de ornamentos identificados por Martínez y colaboradores, mientras que en la Figura 2-14 se muestran las microfotografías de seis especies según cada patrón de ornamentación.

Figura 2-13: Microfotografías de la superficie de los conidios de *Penicillium digitatum* y *Penicillium herquei*⁶ (Hess et al. 1968) .

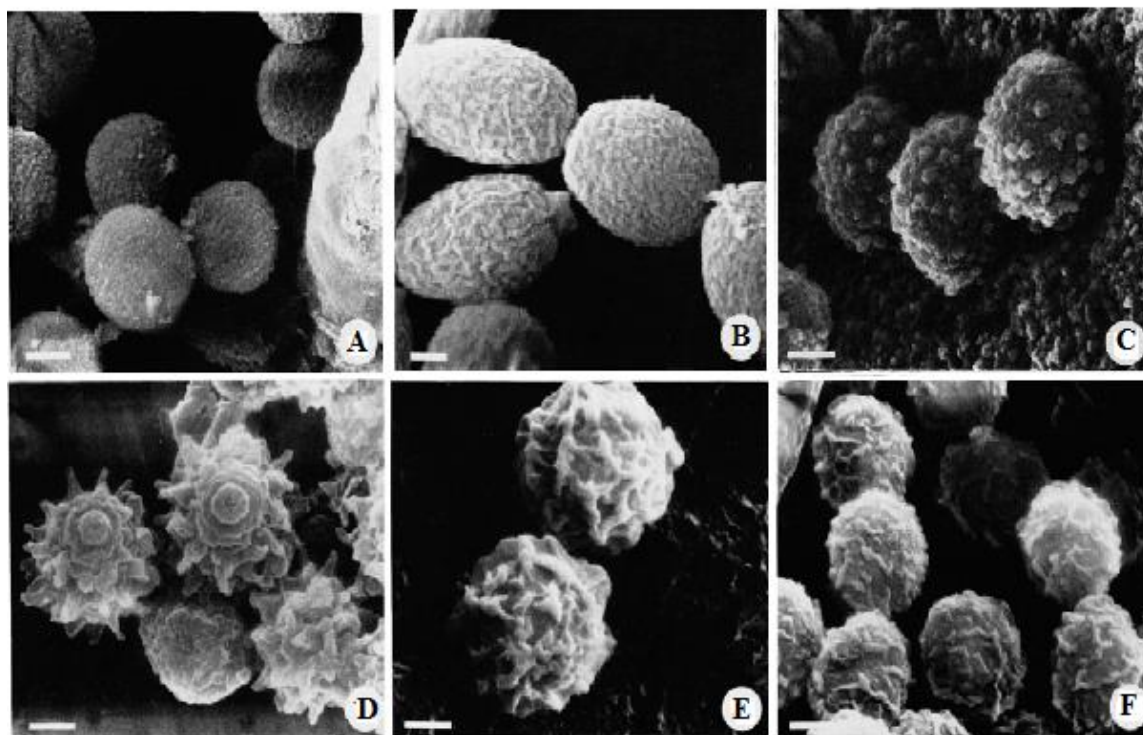


⁶ Microfotografías: A. *Penicillium digitatum* a 33.000X. B. *Penicillium digitatum* a 94.500X. C. *Penicillium herquei* a 33.000X. D. *Penicillium herquei* a 94.500X.

Tabla 2-1: Tipo de ornamentos presentes en la superficie de los conidios de *Penicillium* (Martínez et al. 1982).

Grupo	Tipo de ornamento	Especie representativa	Descripción complementaria
A	Conidios de paredes lisas	<i>P. lavendulum</i>	De pared lisa
		<i>P. yarmokense</i>	Con crestas cortas y delgadas.
		<i>P. expansum</i>	Con protuberancias diminutas.
B	Conidios delicadamente ásperas	<i>P. turbalum</i>	Con crestas delgadas.
		<i>P. pseudostromaticum</i>	Con protuberancias diminutas.
		<i>P. aurantiacum</i>	Con crestas paralelas delgadas.
C	Conidios verrugosos	<i>P. citreovirens.</i>	Verrugosos
		<i>P. verrucosum</i>	Verrugosos
		<i>P. volgaense</i>	Con protuberancias de diferentes tamaños
		<i>P. vasconiae</i>	Con protuberancias gruesas.
D	Conidios espinosos	<i>P. moldavicum</i>	Espinoso
		<i>P. melinii</i>	fuertemente espinosos
E	Conidios con crestas bajas	<i>P. aurantioviolaceum</i>	Con crestas muy cortas.
		<i>P. aragonense</i>	Con aspecto cerebriforme
		<i>P. madriti</i>	Con crestas cortas.
		<i>P. janthinellum</i>	Con crestas y verrugas.
		<i>P. purpurescens</i>	Con crestas
F	Conidios con crestas escasas.	<i>P. verruculosum</i>	Con crestas reticulares.
		<i>P. albidum</i>	con crestas paralelas.
		<i>P. rugulosum</i>	con crestas irregularmente dispuestas
		<i>P. daleae</i>	con crestas paralelas
		<i>P. Striatissporum</i>	con arreglos longitudinales
		<i>P. brevissimum</i>	Con delgadas crestas paralelas.
		<i>P. inflatum</i>	con crestas gruesas y paralelas

Figura 2-14: Microfotografías del tipo de ornamentos presentes en conidios de diferentes especies de *Penicillium*⁷ (Martinez et al. 1982).



2.3.2 Contenido de trehalosa y manitol

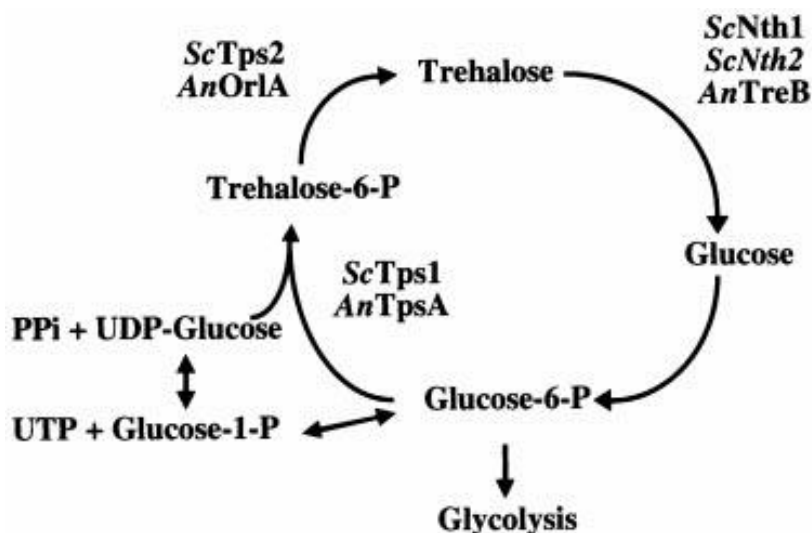
El contenido de trehalosa y manitol ha sido reportado para diversos modelos de hongos filamentosos como factores asociados a la protección contra el estrés (Sussman & Lingappa, 1959). La trehalosa, es un disacárido no reductor presente en muchos organismos pero no en mamíferos, en los hongos se puede encontrar en los cuerpos fructíferos y durante la inducción del crecimiento de las células vegetativas (Teramoto, Sachinvala, & Shibata, 2008); se ha cuantificado hasta un 10% (sobre la base de peso seco) de trehalosa en las ascosporas de *Neurospora tetrasperma*; cuando estas esporas germinaron la concentración de trehalosa disminuyó rápidamente (Crowe, Crowe, &

⁷ A: Conidios de paredes lisas, *P. yarmokense*. B. Conidios con paredes ligeramente ásperas, *P. pseudostromaticum*. C. Conidios verrugosos, *P. vasconiae*. D. Conidios espinosos, *P. melinii*. E. Conidios con crestas bajas, *P. verruculosum*. F. Conidios con crestas escasas, *P. rugulosum*. La barra corresponde a 1µm.

Chapman, 1984). Los mecanismos moleculares a través de los cuales la trehalosa cumple con su papel protector se relacionan con la estabilización de los fosfolípidos de la membrana a niveles diferentes, por un lado puede interactuar con los lípidos a través de la formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilos (OH) de los disacáridos (en sustitución de 10-12 moléculas de agua) y por otro puede interactuar, con los grupos de cabeza polares de los fosfolípidos, sustituyendo así el agua eliminada en la deshidratación y la preservación de la membrana (Feofilova, Usov, Mysyakina, & Kochkina, 2014; Tsvetkov, Tsonev, Tsvetkova, Koynova, & Tenchov, 1989); El otro mecanismo por el cual la trehalosa cumple con su papel protector se ha asociado con la estabilización de proteínas ya que puede establecer puentes de hidrógeno que en condiciones de deshidratación preservan la estructura de la proteína (Wyatt et al. 2013).

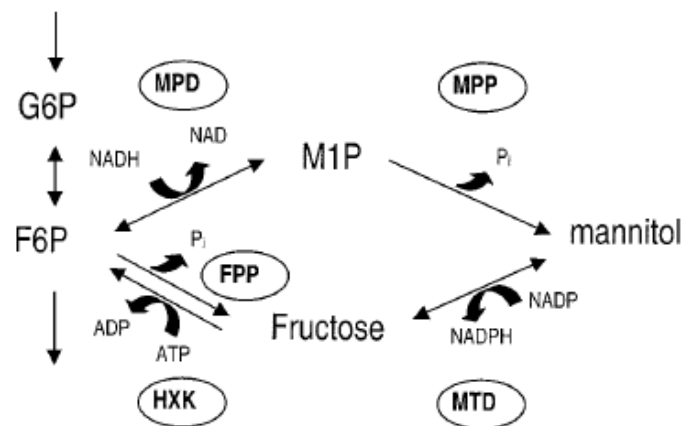
El contenido de trehalosa en conidios de *P. chrysogenum* fue determinado en 1964 y fue cercano a 42 mg/g de conidios secos (Ballio et al. 1964), pero se desconocen estudios que relacionen este contenido con la tolerancia a condiciones de estrés. En otros hongos filamentosos como *Aspergillus nidulans* se encontró trehalosa a altas concentraciones en los conidios producidos cuando el hongo fue sometido a condiciones de estrés térmico u choque oxidativo y esta trehalosa acumulada en los conidios se degradan rápidamente tras la inducción de la germinación (Fillinger et al. 2001). En el metabolismo de la trehalosa intervienen varias enzimas como se muestra en la Figura 2-15, su síntesis es mediada por la trehalosa 6-fosfato sintasa, mientras que su degradación a glucosa ocurre por la catálisis de la trehalasa neutra. La trehalosa-6-fosfato sintasa y otras enzimas relacionadas con el estrés fue identificada en el transcriptoma de *Penicillium glabrum* cuando fue sometido a condiciones de estrés térmico (Nevarez et al. 2008).

Otro compuesto encontrado en hongos sometidos a condiciones de estrés y al que se le atribuyen efectos protectores contra el estrés es el manitol, el manitol es un poliol de la manosa. El papel del manitol contra el estrés ha sido atribuido como crioprotectante principalmente, pero también ha sido implicado como protector durante la desecación y antioxidante y como fuente de reserva de carbono (Feofilova et al., 2014).

Figura 2-15: Metabolismo de la trehalosa en hongos⁸ (Fillinger et al. 2001).

Varias especies de *Penicillium* son capaces de acumular manitol cuando son cultivadas en medio líquido (Hendriksen et al. 1988). El contenido de manitol en conidios de *P. chrysogenum* fue determinado en 1964 y fue cercano a 48 mg/g de conidios secos (Ballio et al. 1964), sin embargo se desconoce su relación con la tolerancia a condiciones de estrés para especies del género. En conidios del hongo filamentoso *Aspergillus niger* representa entre el 10 y el 15% del peso seco, se cree que la biosíntesis de manitol está, hasta cierto punto, regulada durante la conidiogénesis y fue descartado su papel esencial como fuente de reserva de carbono en los conidios de *A. niger*. Pero parece ser esencial para la protección de los conidios de *A. niger* contra el daño celular bajo condiciones de estrés entre ellos el térmico y el oxidativo (Ruijter et al. 2003). El metabolismo del manitol puede ocurrir por la ruta de la fructosa- 6-fosfato (F6P) o por la ruta de la glucosa-6-fosfato (G6P) como se muestra en la Figura 2-16.

⁸ ScTps1 y AnTpsA, Trehalosa-6-fosfato sintasa; ScTps2 y AnOrlA, trehalosa - 6 - fosfato fosfatasa; ScNth1, ScNth2 y AnTreB, Trehalasa neutra; Sc, *S. cerevisiae*; An, *A. nidulans*.

Figura 2-16: Metabolismo del manitol *Aspergillus niger*⁹ (Ruijter et al. 2003).

En el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* se encontró que el cultivo a temperaturas por encima de la temperatura óptima de crecimiento del hongo se asociaba a cambios en el contenido de trehalosa y manitol en el micelio y mostraban una mayor tolerancia y crecimiento después de ser sometido a nuevas condiciones de estrés térmico (Liu, Ying, Feng, & Jiang, 2009) .

Hallsworth & Magan en 1994, encontraron que el contenido de trehalosa y manitol, variaba en los conidios de tres hongos filamentosos *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces farinosus* y *Metarhizium anisopliae* cuando estos fueron cultivados con diferentes concentración y fuentes de carbono; sin embargo en este estudio no se investigó sobre la tolerancia de estos conidios a condiciones de estrés (Hallsworth & Magan 1994).

⁹ Se indican las dos vías posibles para la biosíntesis de manitol a partir de fructosa 6-fosfato, la vía para el catabolismo de manitol y parte de la vía glicolítica. G6P, glucosa 6 - fosfato; F6P, fructosa 6-fosfato; M1P, de manitol-1 fosfato; HXK, hexoquinasa; FPP, fructosa 6-fosfato fosfatasa.

2.4 Antecedentes

2.4.1 *Penicillium* sp. HC1

Penicillium sp. HC1 se seleccionó de un estudio de microorganismos celulolíticos aislados de suelos rizosféricos de cultivos de arroz ubicados en Tolima y Meta, Colombia (Gutiérrez-Rojas et al., 2012). Este aislamiento ha sido depositado en el Centraal Bureau voor Schimmel Cultures Fungal Biodiversity Center (CBS-KNAW) como CBS 136205.

2.4.2 Influencia de la fuente de carbono y nitrógeno en la conidiogénesis de *Penicillium* sp. HC1 en medio de cultivo sólido y líquido.

En 2015 Gutiérrez-Rojas y colaboradores, evaluaron el efecto de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno a través de un diseño factorial de dos variables que resultó en 20 combinaciones de medios de cultivo que son mostradas en la Tabla 2-2.

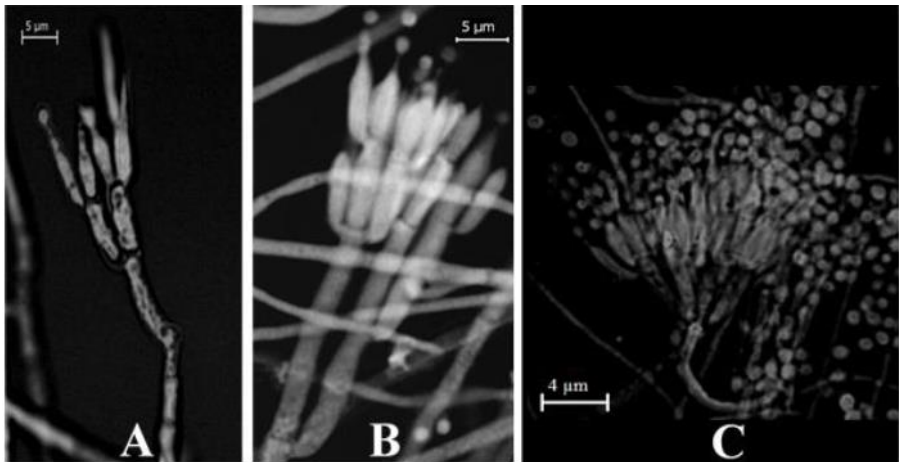
Tabla 2-2: Medios de cultivos según fuente de carbono y nitrógeno (Gutiérrez-Rojas et al. 2015) .

Número del medio	Fuente de Carbono (g.L ⁻¹)	Fuente de Nitrógeno (g.L ⁻¹)	Número del medio	Fuente de Carbono (g.L ⁻¹)	Fuente de Nitrógeno (g.L ⁻¹)
1	Sacarosa (20.00)	Triptosa (7.98)	11	Harina de Almidón (21.59)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (4.57)
2	Sacarosa (20.00)	Extracto de levadura (9.18)	12	Harina de Almidón (21.59)	KNO ₃ (7.00)
3	Sacarosa (20.00)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (4.63)	13	Salvado de trigo (27.00)	Triptosa (7.42)
4	Sacarosa (20.00)	KNO ₃ (7.08)	14	Salvado de trigo (27.00)	Extracto de levadura (9.04)
5	Glucosa (20.00)	Triptosa (7.58)	15	Salvado de trigo (27.00)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (4.30)
6	Glucosa (20.00)	Extracto de levadura (8.72)	16	Salvado de trigo (27.00)	KNO ₃ (6.58)
7	Glucosa (20.00)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (4.40)	17	Harina de arroz (21.31)	Triptosa (5.67)
8	Glucosa (20.00)	KNO ₃ (6.73)	18	Harina de arroz (21.31)	Extracto de levadura (6.90)
9	Harina de Almidón (21.59)	Triptosa (7.88)	19	Harina de arroz (21.31)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (3.28)

10	Harina de Almidón (21.59)	Extracto de levadura (9.60)	20	Harina de arroz (21.31)	KNO ₃ (5.03)
----	------------------------------	--------------------------------	----	----------------------------	-------------------------

Cada una de las combinaciones del medio resultante fue evaluada en cultivo sólido y en cultivo líquido y se determinó la influencia en la formación de conidióforos, la producción de conidios y tolerancia a condiciones de estrés. Gutiérrez-Rojas y colaboradores encontraron que tanto el estado del medio de cultivo como el tipo y combinación de la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno se asocian a la formación de conidióforos de complejidad diferente (Figura 2-18). La producción de conidios en medio sólido como en medio líquido, fue afectada en ambos casos por la fuente de carbono y la interacción de la fuente de carbono con la fuente de nitrógeno; aunque en el caso de la producción de conidios en medio líquido la fuente de nitrógeno no resulto significativa para el modelo pero si su interacción con la fuente de carbono, los resultados son mostrados en la Tabla 2-3.

Figura 2-17: Conidióforos y conidios de *Penicillium* sp. HC1 después de 4 días de incubación a 28°C en diferentes medios ¹⁰ (Gutiérrez-Rojas et al. 2015)



Cuando se evaluó la tolerancia térmica de los conidios a un tratamiento térmico de 50°C por 1 hora, se encontró que para los conidios producidos en medios líquidos en los que se combinó una fuente de carbono compleja como la harina de almidón y una fuente de

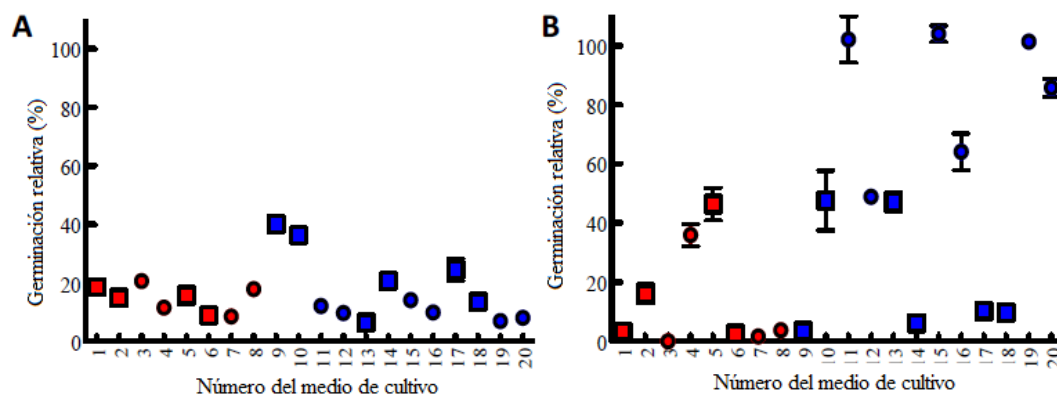
¹⁰ A: Medio líquido (ME11), B: Medio sólido - fuente de carbono simple (ME5), C: Sólido medio - fuente de carbono complejo (ME17). 100X

nitrógeno inorgánica como el fosfato diamónico, los porcentajes de germinación relativos fueron cercanos al 100% (Figura 2-19).

Tabla 2-3: Efecto de las fuentes de carbono y nitrógeno en la producción de conidios, en medios sólidos y líquidos (Gutiérrez-Rojas et al. 2015).

Factor	Producción de conidios			
	Conidios en medio sólido (mm ⁻²) ⁻¹		Conidios en medio líquido (Conidios. mL ⁻¹)	
	F- Valor	P-Valor	F- Valor	P-Valor
A-Fuente de carbono	37,80	< 0,0001	22,42	< 0,0001
B-Fuente de nitrógeno	16,67	< 0,0001	0,084	0,9686
A x B	10,11	< 0,0001	4,47	< 0,0001
Modelo		< 0,0001	7,55	< 0,0001
R-Cuadrado		0,8897		0,705
R-Cuadrado ajustado		0,8372		0,6119
Adecuada precisión		16,836		8,814

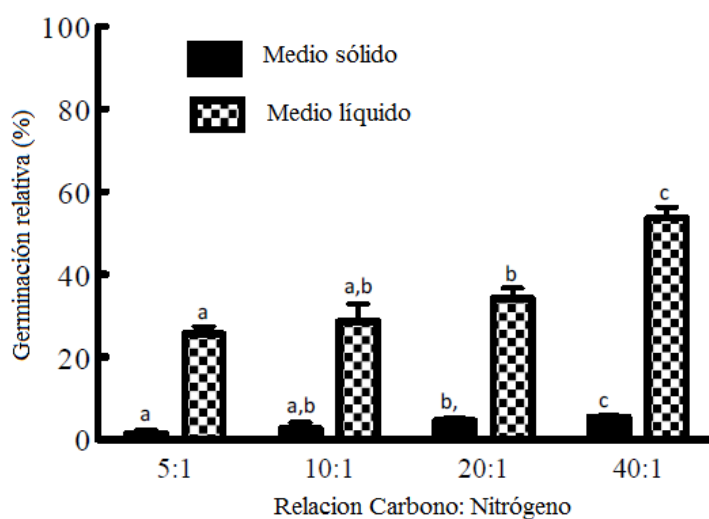
Figura 2-18: Supervivencia de *Penicillium* sp. HC1 obtenidos en diferentes medios de cultivo expuestos a estrés térmico¹¹(Gutiérrez-Rojas et al. 2015) .



¹¹ El estrés térmico usado fue de un tratamiento térmico a 50 ° C durante una hora. Medio sólido (A), medio líquido (B). Los símbolos rojos representan fuentes simples de carbono y los símbolos azules representan fuentes carbono complejas. Los símbolos cuadrados representan la fuente de nitrógeno orgánico y los símbolos redondos representan la fuente de nitrógeno inorgánico.

Al cambiar la relación C:N en un medio líquido que presentó un porcentaje de germinación relativo bajo (menor del 20%), se encontró que a medida que la relación C: N aumentaba la tolerancia térmica también. Estos resultados sugieren que la limitación por nitrógeno afecta la calidad de los conidios producidos en medio líquido (Figura 2-20).

Figura 2-19: Efecto de la relación carbono: nitrógeno sobre la tolerancia a la tolerancia térmica de los conidios *Penicillium* sp. HC1¹²(Gutiérrez-Rojas et al. 2015).



La pregunta que surge es ¿sí la limitación por nutrientes, carbono o nitrógeno, en cultivo líquido de *Penicillium* sp HC1, induce una mayor producción de conidios y/o influye en las características de calidad de los conidios?

¹² El estrés térmico usado fue de un tratamiento térmico a 50 ° C durante una hora. Medio líquido 8 (Glucosa, Nitrato de potasio) y medio sólido PDA

2.5 Objetivos

2.5.1 Objetivo general

Determinar el efecto de la fuente de carbono (C) y nitrógeno (N), la concentración de carbono y la relación C:N en medio líquido, sobre la tolerancia a condiciones de estrés térmico, acumulación de trehalosa y/o manitol y cambios en la superficie de la pared celular de los conidios de *Penicillium* sp. HC1

2.5.2 Objetivos específicos

- Evaluar la influencia de la fuente de carbono y nitrógeno, la concentración de carbono y la relación C:N en medio líquido, sobre la producción de conidios de *Penicillium* sp. HC1 y su tolerancia a estrés térmico.
- Determinar la relación entre el contenido de trehalosa y manitol y la tolerancia a estrés térmico de los conidios de *Penicillium* sp. HC1 obtenidos en medio líquido con diferentes concentraciones de carbono, fuente de carbono y nitrógeno y relación C:N.
- Determinar cambios en las características de la superficie de la pared celular de los conidios de *Penicillium* sp. HC1 con tolerancia diferencial a condiciones de estrés térmico.

3 Metodología

3.1 Medios de cultivo y condiciones de cultivo

3.1.1 Banco de trabajo y obtención del inóculo

Se tomó un vial del banco de microorganismos del Laboratorio de Fermentaciones del IBUN, de *Penicillium* sp HC1 obtenido de un cultivo monospórico y conservado a -20°C, el vial fue descongelado y 300 µL de la suspensión fueron sembrados por triplicado en la superficie de una placa de Petri que contenía agar PDA (en g/L: extracto de papa, 4; dextrosa, 20; agar-agar, 15; pH 5,6), cada placa se incubó a 25°C por 8 días. Al día 8 de incubación, la superficie de cada placa fue raspada con 5mL de solución salina 0.05% (p/v) con Tween 80 al 0,1% (v/v), el raspado fue recolectado y filtrado con algodón estéril y posteriormente centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue descartado y los conidios concentrados fueron lavados dos veces con solución salina 0.05% (p/v) con Tween 80 al 0,1% (v/v). La concentración de conidios fue ajustada a 10⁸ conidios/mL. El volumen obtenido se mezcló con glicerol al 20% (v/v) estéril y 1 mL de esta mezcla fue distribuido en nuevos crio-viales y congelado a -20°C para conformar el banco de trabajo.

El inóculo se preparó a partir de crioviales del banco de trabajo, cada criovial fue descongelado y 300 µL de la suspensión fueron sembrados por triplicado en la superficie de una placa de Petri que contenía agar PDA, cada placa se incubó a 25°C por 8 días. Al día 8 de incubación, la superficie de cada placa fue raspada con 5mL de solución salina 0.05% (p/v) con Tween 80 al 0,1% (v/v), el raspado fue recolectado y filtrado con algodón estéril y posteriormente centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue descartado y los conidios concentrados fueron lavados dos veces con solución salina

0.05% (p/v) con Tween 80 al 0,1% (v/v). La concentración de conidios fue ajustada entre 2.0×10^8 y 3.0×10^8 conidios/mL.

3.1.2 Medios de cultivo

Se evaluaron dos fuentes de carbono: sacarosa y harina de almidón a dos concentraciones iniciales 10g/L y 5 g/L; dos fuentes de nitrógeno: fosfato de amonio (como fosfato diamónico, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) y extracto de levadura; a cinco relaciones C: N: 10:1, 30:1, 50:1, 80:1 100:1, a través de un diseño factorial completo. Estas variables resultaron en 40 combinaciones de medios posibles que por triplicado resultaron en 120 unidades experimentales que fueron seleccionadas completamente al azar, el diseño y la aleatorización de las muestras fueron realizados con el programa Design Expert® 9.0.0. Las combinaciones para los medios que contenían sacarosa son mostradas en el Anexo A, y las combinaciones para los medios que contenían harina de almidón son mostradas en el Anexo B. Se prepararon 100 mL de cada medio de cultivo por triplicado en Erlenmeyer de 250 ml, con una base de sales cuya composición en g/L: fue de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, KCl 0,5 g, KH_2PO_4 1 g, CaCO_3 0,5 g, con 100 μL de solución de micronutrientes (La composición de los micronutrientes es mostrada en el Anexo C), el pH de cada medio de cultivo se ajustó a 6,5 con ácido fosfórico o hidróxido de sodio, antes de ser esterilizados. Para el diseño factorial los medios de cultivos estériles fueron inoculados con 10 ml de una concentración de 2.5×10^8 conidios/ml de conidios de *Penicillium sp* HC1. Cada medio inoculado fue incubado a 25°C a 150 rpm en una incubadora con agitador orbital acoplado por 8 días.

3.2 Determinación de biomasa en peso seco.

Después del tiempo de incubación y crecimiento, 50 ml del medio de cultivo fueron puestos en tubos Falcón de 50ml, estériles, secos y pesados previamente. El tubo fue centrifugado a 5000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue descartado, mientras que el precipitado fue lavado dos veces con solución salina 0.05% (p/v) con Tween 80 al 0,1% (v/v) hasta completar un volumen de 50 ml y fueron secados a 65°C hasta peso constante. El peso de la biomasa seca se determinó por la diferencia entre el peso inicial y el peso final del contenido de cada tubo.

3.3 Determinación del número de conidios.

Para determinar el número de conidios se realizó conteo en cámara de Neubauer. 1 ml del medio de cultivo inoculado e incubado por 8 días, fue suspendido en 9 ml de solución salina estéril para obtener una dilución 10^{-1} . La dilución fue homogenizada en un agitador vortex a 1000 rpm por 30 segundos y 10 μ L de la dilución fueron puestos en una cámara de Neubauer marca Boeco línea brillante, el conteo por duplicado de conidios fue hecho en un microscopio NIKON E200 en el objetivo 40X.

3.4 Determinación de la viabilidad de los conidios

Se determinó el porcentaje de germinación en agar agua. Para esto se sembraron 3 alícuotas de una suspensión de conidios a una concentración de 10^6 conidios/mL, de 10 μ L c/u, en el área de 1cm^2 dibujado en la superficie de una caja de agar agua y se incubó a 25°C durante 18 a 20 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, 10 μ L de azul de lactofenol fueron adicionados y la caja fue refrigerada hasta el momento del conteo. Se obtuvieron los fragmentos de agar en donde fueron inoculados los conidios. El porcentaje de germinación se determinó por observación en un microscopio NIKON E2000 contando un mínimo de 100 conidios (germinados y no germinados), por alícuota, en objetivo de 100x.

3.5 Determinación de la tolerancia a condiciones de estrés térmico

Para la determinación de la tolerancia a estrés térmico de los conidios, se tomaron alícuotas de 1 mL de suspensión de conidios a una concentración de 10^6 conidios. mL^{-1} , y se sometieron a $50^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ por una hora, como control se tomó una alícuota a temperatura ambiente (metodología modificada de (García-Rico, Martín et al. 2011)). Después del tiempo de tratamiento se estableció el porcentaje de germinación como se describió en el numeral 3.4.

3.6 Determinación del contenido de Trehalosa y manitol

3.6.1 Obtención de los conidios

Los medios de cultivo S5E100, S10E10, S10F50, A10E50, A5E50, A10F10 y A5F10, cuya composición y tolerancia se muestran en el Anexo N, fueron inoculados con una suspensión de conidios a una concentración de 2.5×10^8 conidios/mL en relación 1:10 e incubados a 25°C, 150 rpm por 8 días. Transcurrido el tiempo de incubación cada uno de los medios de cultivo fue filtrado y luego centrifugado a 10.000 rpm en una ultracentrífuga Thermo Scientific con rotor 34 por 10 minutos a 4 °C, los conidios concentrados fueron lavados tres veces con solución salina tween 80 a 0.1%, estéril y transferidos a tubos de microcentrifuga eppendorf de 1.5 mL, a una concentración de 3×10^8 conidios/mL. Una suspensión de conidios a una concentración de 3×10^8 conidios/mL obtenidos en agar papa dextrosa incubadas a 25°C durante 8 días fue usada como control.

Determinación del contenido de trehalosa y manitol por HPLC

Los conidios obtenidos en 3.6.1 fueron secados a 65°C hasta peso constante (Liu et al. 2008). Una vez secos, los conidios fueron resuspendidos en agua ultrapura (obtenida en un purificador Milli-Q®) de manera que se obtuvo una concentración de 20 a 40 mg de conidios secos/mL. Alícuotas de 800 µL fueron sometidas a ebullición por 3 horas (Yanutsevich et al. 2014). Después del tratamiento térmico las muestras fueron centrifugadas, se colectó el sobrenadante (extracto), se filtró por 0,22 µm y se congeló a -20°C para posterior análisis por HPLC. Los extractos fueron analizados en un cromatógrafo Thermo Scientific® – Dionex UltiMate 3000, provisto con una bomba cuaternaria y un detector Sedex® Sedere LT-ELSD, con nebulización por nitrógeno. Se utilizó una columna Sugar SZ5532 Shodex®, la fase móvil fue una mezcla de ACN:H₂O (75:25) a un flujo de 0,5 mL/min y una temperatura del horno de 50°C, el volumen de inyección fue de 10 µL. La curva patrón se construyó utilizando trehalosa (Sigma® T9449) y manitol (Sigma® 63560) comerciales, en un intervalo de 0,4 a 1,4 mg/mL, correspondientes a los límites inferior y superior de detección de la señal. La señal de detección del manitol fue de 15,10 minutos y la de la trehalosa fue de 17,85 (Anexo M). Todas las determinaciones se hicieron mínimo por triplicado.

3.7 Microscopia electrónica de barrido

Los medios de cultivo en estado líquido S5E100, S10E10, S10F50, A10E50, A5E50, A10F10 y A5F10, cuya composición y tolerancia se muestran en la Tabla 3-1, fueron inoculados con una suspensión de conidios a concentración de 1×10^8 conidios.mL⁻¹ en relación 1:10 e incubados a 25°C, 150 rpm por 8 días. Transcurrido el tiempo de incubación cada uno de los medios de cultivo fue filtrado y luego centrifugado a 10000 rpm en una ultracentrifuga Thermo Scientific con rotor 34 por 10 minutos a 4 °C, los conidios concentrados fueron lavados tres veces con solución salina tween 80 a 0.1%, estéril y transferidos a tubos de microcentrifuga eppendorf de 1.5 mL, a una concentración de 3×10^8 conidios/mL. Una suspensión de conidios a una concentración de 3×10^8 conidios/mL obtenidos en agar papa dextrosa incubadas a 25°C durante 8 días fue usada como control. Los conidios obtenidos en los medios de cultivo líquido fueron fijados con solución de glutaraldehído al 2.5% en PBS (Buffer fosfato salino a pH 7.2) a 48 °C por 2 horas tiempo después del cual fueron lavados tres veces con PBS. La deshidratación de los conidios se realizó usando diluciones seriadas de etanol absoluto de 75, 95 y 100% por 20 minutos. Las muestras deshidratadas fueron puestas en papel filtro y secadas a punto crítico en un equipo SAMDRI®-795 a 1600 psi, 40°C por una hora y luego fueron fijadas a monedas en un porta muestras y recubiertas con oro en un equipo metalizador Desk® IV a 4 Torr. en. Las muestras fueron observadas en un microscopio electrónico de barrido en condiciones de alta presión en un equipo JEOL, modelo JSM 6490-LV de última generación, se recorrieron campos aleatoriamente y se fotografiaron conidios representativos a 30Kv a 35.000X.

3.8 Caracterización Microscópica

Los medios de cultivo S5E100, S10E10, S10F50, A10E50, A5E50, A10F10 y A5F10, cuya composición y tolerancia se muestran en la Tabla 3-1, fueron inoculados con 10 mL de una suspensión de 2.5×10^8 conidios/mL hasta un volumen de 100 mL en Erlenmeyer de 250 mL, e incubados a 25°C, 150 rpm por 8 días. El día 8 100 µL del medio de cultivo fueron mezclados con 100 µL de azul de lactofenol. 10 µL de la mezcla fueron puestos en la superficie de una lámina portaobjetos que soportaba 1 cm² de agar agua para ser observado en un microscopio en un microscopio óptico LEICA DM1000 con cámara digital marca Leica modelo ICC50 HD y software Leica Application Suite Version 2.1.0 a 100 X. Mínimo 4 campos al azar fueron fotografiados y posteriormente los conidios y conidióforos observados fueron caracterizados y medidos según Visagie *et al.* (2014)

3.9 Perfil de germinación

Los medios de cultivo S5E100, S10E10, S10F50, A10E50, A5E50, A10F10 y A5F10, cuya composición y tolerancia se muestran en la Tabla 3-1, fueron inoculados con 10 mL de una suspensión de 2.5×10^8 conidios/mL hasta un volumen de 100 mL en Erlenmeyer de 250 mL, e incubados a 25°C, 150 rpm. 100 µL del medio de cultivo fueron mezclados con 100 µL de azul de lactofenol a las horas 3, 6, 12, 24, 30, 48 y 96 horas de incubación. 10 µL de la mezcla fueron puestos en la superficie de una lámina portaobjetos que soportaba 1 cm² de agar agua para ser observado en un microscopio en un microscopio óptico LEICA DM1000 con cámara digital marca Leica modelo ICC50 HD y software Leica Application Suite Version 2.1.0 a 100X. Se contó un mínimo de 100 conidios (germinados y no germinados) por alícuota en objetivo de 100x.

4 Resultados y discusión de resultados

4.1 Influencia de la fuente de carbono y nitrógeno, la concentración de carbono y la relación C:N, en medio líquido, sobre la producción de conidios de *Penicillium* sp. HC1 y su tolerancia a estrés térmico

Un diseño factorial completo fue establecido para la evaluación del efecto de la fuente de carbono, fuente de nitrógeno, relación C:N y concentración de carbono en medio líquido sobre la producción de conidios de *Penicillium* sp. HC1. Las variables respuestas, biomasa, número de conidios, porcentaje de viabilidad y tolerancia térmica se analizaron estadísticamente usando el programa Minitab versión 17.0. y se encontró que después de las transformaciones requeridas los residuos de las variables se ajustaron a una distribución normal con varianzas iguales (Anexo E, F, G y H) y los datos para cada variable respuesta se ajustaron a un modelo de regresión lineal con interacciones dobles, triples y cuádruples (Anexo I, J, K y L). Un resumen con los valores F y P de los resultados del análisis de varianza de la regresión factorial general se muestran para cada variable en la Tabla 4-1.

- **Producción e biomasa**

Se observó que la producción de biomasa de *Penicillium* sp. HC1 depende de la interacción entre los factores evaluados (fuente de carbono, fuente de nitrógeno, relación C:N y concentración de carbono). Los resultados se muestran en la Figura 4-1. En el panel A, el gráfico de efectos principales por factores y niveles de la variable para la media ajustada predicha por el modelo, muestra que los valores medios más altos fueron obtenidos con los para los niveles sacarosa, fosfato diamónico, relación C:N 10:1 y concentración de carbono de 10g/L. Las diferencias observadas entre niveles fueron estadísticamente significativas, excepto para el factor fuente de nitrógeno; sin embargo, el modelo estadístico mostró que las interacciones dobles, triples y cuádruples que involucra la fuente de nitrógeno también presentaron

diferencias estadísticamente significativas (Tabla 4-1), motivo por el cual este factor no puede dejar de ser considerado para la producción de biomasa. En consecuencia se encontró que para la combinación de las fuentes de carbono sacarosa y harina de almidón (Figura 4-1 Panel B y el panel C) la cantidad máxima de biomasa producida está determinada por la fuente de nitrógeno, la concentración de carbono y la relación de carbono nitrógeno empleada y en ambos casos fue de 7g/L usando fosfato diamónico, a concentraciones de 10g/L, relación 10:1. También se observó que mientras para la fuente definida de carbono sacarosa la combinación con la fuente de nitrógeno parece no tener un papel significativo en la producción de biomasa, para la fuente compleja harina de almidón el tipo de fuente de nitrógeno juega un papel en la producción de biomasa y dependiendo de la concentración de la fuente de carbono, también se vuelve significativa la relación C:N en la producción de biomasa.

Tabla 4-1: ANOVA del efecto de la fuente de carbono (C) y nitrógeno (N), la concentración inicial de carbono y la relación C: N en la producción de biomasa, conidios, viabilidad y tolerancia térmica de los conidios de *Penicillium sp.* HC1¹³.

ANOVA	Biomasa		Número de conidios		% de Viabilidad		Tolerancia térmica	
	Valor F	Valor P	Valor F	Valor P	Valor F	Valor P	Valor F	Valor P
Modelo Lineal	70,050	0,000	24,020	0,000	17,600	0,000	20,760	0,000
Carbono	104,030	0,000	1,970	0,164	6,050	0,016	6,440	0,013
Nitrógeno	1,560	0,215	0,610	0,438	6,070	0,016	4,730	0,033
C:N	19,440	0,000	13,520	0,000	20,890	0,000	5,800	0,000
[Ci]	309,970	0,000	111,480	0,000	26,980	0,000	113,230	0,000
Interacciones de 2 términos	10,660	0,000	20,250	0,000	12,140	0,000	25,240	0,000
Interacciones de 3 términos	5,470	0,000	9,370	0,000	6,460	0,000	13,810	0,000
Interacciones de 4 términos	4,670	0,002	3,390	0,013	8,110	0,000	8,990	0,000
R –Cuadrado	90,99%		88,36%		83,93%		90,37%	
R-Cuadrado ajustado	86,37%		82,69%		76,00%		85,49%	
R-Cuadrado predicho	78,22%		73,81		62,51		76,80%	
Preción de ajuste	0,0820092		0,263554		0,473586		0,908566	

¹³ Los P- valor, inferiores a 0,05 indican que los términos del modelo son significativos a un nivel de significancia del 95%. La diferencia entre el R cuadrado predicho y el R cuadrado ajustado deber ser menor que 0,2. La "Adecuada Precisión" mide la relación señal-ruido; es deseable una relación mayor que 4. La transformación de las variables respuestas, el análisis gráfico y las pruebas de hipótesis para la verificación del cumplimiento de los supuestos de normalidad y homocedasticidad de los residuos de los datos se presentan en los Anexos: E, F, G Y H, para cada una de las variables analizadas. El modelo de regresión factorial general para por factores y niveles de los factores evaluados y las gráficas de interacciones completas se muestran en los Anexo: I, J, K y L.

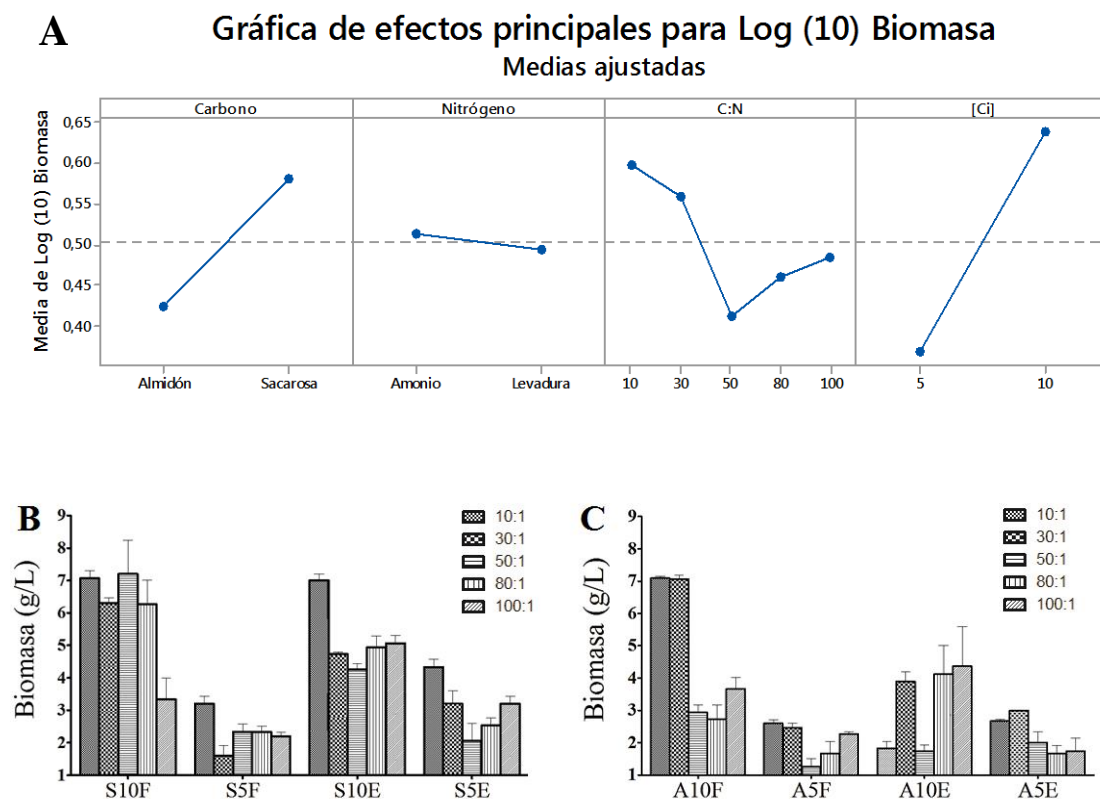


Figura 4 -1: Efecto de la fuente de carbono, concentración inicial de la fuente de carbono, fuente de nitrógeno y relación C:N en la producción de biomasa y conidios de *Penicillium* sp HC1, en medio líquido¹⁴.

La producción de biomasa de otras especies de *Penicillium* se ha evaluado usando varios de los factores que se evaluaron en este estudio sin embargo no se encontraron publicaciones donde se evaluaron los cuatro factores a la vez y algunos resultados son comparables con los obtenidos en este estudio para *Penicillium* sp HC1 por ejemplo, Bockelmann, W. *et al.*, 1999 encontraron para *P. camemberti* que la mayor concentración de biomasa se producía a la mayor concentración de carbono evaluada; así como en este estudio la mayor concentración de

¹⁴ *Penicillium* sp HC1 fue cultivado a 25°C, 150 rpm durante 8 días. A. Gráfica de efectos principales por factores y niveles para la media de la variable Biomasa. Producción de biomasa por fuentes de carbono B y C. B: Medios con sacarosa (S); en C: medios con almidón (A). La combinación de fuente de carbono, concentración inicial y fuente de nitrógeno de cada grupo de barras corresponde a: S o A10F (Sacarosa o Almidón 10g/L, fosfato de amonio), S o A5F (Sacarosa o Almidón 5g/L, fosfato de amonio), S o A10E (Sacarosa o Almidón 10g/L, extracto de levadura), S o A5E (Sacarosa o Almidón 5g/L, extracto de levadura). Cada barra representa a una relación C: N, 10:1, 30:1, 50:1 y 100:1 según la etiqueta. La línea sobre la barra representa la desviación estándar de tres experimentos n=3

biomasa promedio se obtuvo a la mayor concentración evaluada, 10 g/L, resultado que es esperado ya que la síntesis de las macromoléculas y el metabolismo energético del organismo dependen de la cantidad de carbono disponible. Bockelmann, W. *et al*, también encontraron que los medios de cultivos en los que se usó glucosa y acetato de amonio, el acetato de amonio era metabolizado más rápidamente, en este estudio se encontró que *Penicillium* sp HC1 tuvo mayor producción de biomasa promedio en los medios con la sacarosa que en los que contenían harina de almidón y en los medios con fosfato de amonio en cambio de los que contenían extracto de levadura. Los hallazgos Bockelmann, W. *et al*, y los presentados en este estudio, sugieren que *Penicillium* sp metaboliza más rápido las fuentes menos complejas de nutrientes carbono o nitrógeno. Del mismo modo se puede observar (Figura 4-1 panel C grupo A10E) que cuando se usaron las más altas concentraciones de fuentes complejas como la harina de almidón y el extracto de levadura, se produjo la menor concentración de biomasa, el efecto es este caso, tendió a ser reversible cuando se aumentó la relación C:N, se cree que ocurre porque al aumentar la relación C:N se disminuye la concentración de la fuente de N usada y por efectos de la esterilización en el medio de cultivo puedan estar en forma libre más nutrientes que cuando ambas fuentes están a mayor concentración. Para próximos estudios se sugiere determinar la concentración de amonio libre en ambas condiciones luego de la esterilización con el fin de probar esta hipótesis.

Por otro lado, en relación a la influencia del tipo de fuente de nitrógeno en la producción de biomasa, para *Penicillium* sp HC1 se encontró que el efecto del tipo de fuente de la fuente de carbono y cuando la fuente de carbono es definida como la sacarosa a concentraciones 10g/L relación C:N 10:1 la fuente de nitrógeno parece no influir significativamente en la producción de biomasa, sin embargo Boualem, K. *et al.*, 2016 usando glucosa a concentraciones de 50g/L encontraron que para *P. camemberti* en cultivo sumergido se produjo una mayor concentración de biomasa cuando se usó extracto de carne que cuando usó nitrato de potasio. Esto podría explicarse por el hecho de que la presencia de grandes concentración de una fuente de carbono simple como la glucosa puedan favorecer en principio un mayor síntesis de biomasa que a su vez permita que se metabolice mejor una fuente orgánica y compleja de nitrógeno como el extracto de carne, que como el mismo menciona, es una fuente que puede aportar otros nutrientes como vitaminas y aminoácidos libres lo que también puede favorecer un mayor crecimiento del hongo (Boualem et al. 2016).

En el ciclo de vida asexual del hongo la síntesis de biomasa se asocia a la fase de crecimiento vegetativo (Canteri & Ghoul 2015; Krasniewski et al. 2006); sin embargo, una mayor producción de biomasa no necesariamente se asocia con una mayor producción de conidios. Los primeros estudios de caracterización de las condiciones de cultivo para la producción de conidios en medio líquido realizados por Gutiérrez-Rojas en 2017 mostraron que usando la formulación líquida de los medios empleados tradicionalmente para estudiar hongos como el caldo papa dextrosa en condiciones de cultivo sumergido *Penicillium* sp HC1 produce biomasa pero no produce estructuras de diferenciación, ni produce conidios al día 8 de cultivo. Boualem, K. et al., 2016, también observó estos resultados en los medios de cultivo con glucosa 50g/L y extracto de carne al día 6 de cultivo para *Penicillium camembert*. Es posible que por la concentración posiblemente alta de nutrientes, en ambos casos y al tiempo de cultivo evaluado 8 y 6 respectivamente, el hongo aun sense suficiente cantidad de nutrientes que lo mantenga en estado de crecimiento vegetativo, estos resultados podrían apoyar la idea de que *Penicillium* sp. HC1 al igual que otras especies de *Penicillium* y otros hongos filamentosos requieren condiciones de limitación por nutrientes como inductores de la conidiogénesis (Roncal & Ugalde 2003).

- **Producción de conidios**

En este estudio se quiso evaluar combinado fuentes de carbono y nitrógeno definidas y complejas, el efecto de la limitación por carbono y nitrógeno en medio líquido sobre la producción de conidios de *Penicillium* sp. HC1, para lo cual se usaron dos niveles del factor concentración de carbono (10g/L y 5g/L) y cinco niveles del factor relación C:N (10:1, 30:1, 50:1, 80:1 y 100:1), respectivamente. Por lo tanto, en este estudio, una concentración de carbono de 5g/L es considerada como la condición de mayor limitación por carbono y para el caso de la limitación por nitrógeno, esta depende de la relación C:N usada, por ejemplo la condición de menor limitación por nitrógeno corresponde a la relación C:N 10:1 y en consecuencia la de mayor limitación corresponde a la relación C:N 100:1. Para determinar si estos factores afectan la conidiogénesis se evaluó la producción de conidios de *Penicillium* sp HC1 en medio líquido al día ocho. El análisis factorial completo presentado en la Tabla 4-1 mostró que la concentración de carbono, la relación C:N, las interacciones dobles, triples y cuádruples de los factores evaluados tienen un efecto significativo en la producción de conidios a un nivel de significancia del 95%, mientras que la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno como factores únicos no tienen efecto significativo en la producción de conidios. De los factores evaluados y sus interacciones la concentración de carbono fue el factor con mayor valor F, lo

que sugiere que este hace el mayor aporte de diferencia entre los resultados.

En la Figura 4-2 se muestran los resultados de la producción de conidios, el panel A, el gráfico de efectos principales por factores y niveles de la variable para la media ajustada predicha por el modelo factorial, muestra que los valores medios más altos en la producción de conidios por niveles se obtuvieron con harina de almidón (Figura 4-2 C), fosfato diamónico, relación C:N 50:1 a concentración de carbono de 10g/L. Cuando se usó sacarosa 10g/L con fosfato diamónico, se observó que la limitación por nitrógeno tiene un papel sobre la producción de conidios, la cual se incrementa en la medida que se aumenta la relación C:N hasta 80:1; la mayor producción de conidios cercana a las 8 unidades logarítmicas se obtuvo con sacarosa 10g/L relación 50:1. (Figura 4-2, panel B). Usando harina de almidón con extracto de levadura, se observó que la producción de conidios es casi constantes y no depende ni de la concentración de carbono ni de la relación C:N (Figura 4-2, panel C).

Así como otras especies de *Penicillium* y hongos filamentosos, responden a la limitación por nutrientes produciendo conidios posiblemente como estrategia natural para dispersarse y sobrevivir en condiciones adversas (Roncal & Ugalde 2003; Yao et al. 2016); *Penicillium* sp HC1 responde también a estos factores: limitación por carbono y nitrógeno. Relacionados con la limitación por carbono se encontró que aunque 10g/L fue la mayor concentración evaluada en este estudio, comparada con la concentración de carbono evaluada por Gutiérrez-Rojas y colaboradores en 2015, que fue de 20g/L en este caso 10g/L puede representar también una condición de limitación por carbono y la mayor producción media de conidios se obtuvo usando harina de almidón, una fuente de carbono compleja cuya complejidad puede suponer una limitación por carbono. Resultados de otros estudios como los presentados por Bockelmann y colaboradores, coinciden con estas observaciones. Ellos evaluaron la producción de conidios en cultivo sumergido para *P. camemberti*, a diferentes concentraciones de glucosa y obtuvieron mayor producción de conidios a una concentración de glucosa de 10g/L que a una concentración de glucosa de 30g/L (Bockelmann et al. 1999). Relacionados con la limitación por nitrógeno se encontró que la mayor producción de conidios se dio a una relación C:N 50:1 una condición de limitación por nitrógeno, resultados similares fueron obtenidos por Boualem, K. y colaboradores, 2016 que para *P. camemberti* en cultivo sumergido encontraron que variando la concentración de glucosa o una concentración fija de nitrato de amonio o variando la concentración de nitrato de amonio a una concentración fija de glucosa la mayor producción de conidios ocurría en condiciones donde la relación C:N era superior a 100:1, lo que

corresponde a una condición de limitación por nitrógeno (Boualem et al. 2016).

Gutiérrez-Rojas y colaboradores en 2015 encontraron que la producción de conidios de *Penicillium* sp HC1, se afecta significativamente por la fuente de carbono y por la interacción entre la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno pero no por la fuente de nitrógeno; en comparación en esta investigación se encontraron resultados similares para la fuente de nitrógeno como único factor la cual tampoco tiene efecto significativo en la producción de conidios y para las dos fuentes de carbono evaluadas el modelo estadístico también indica que la fuente de carbono como único factor tampoco tiene efecto significativo en la producción de conidios pero para ambos factores sus interacciones son importantes.

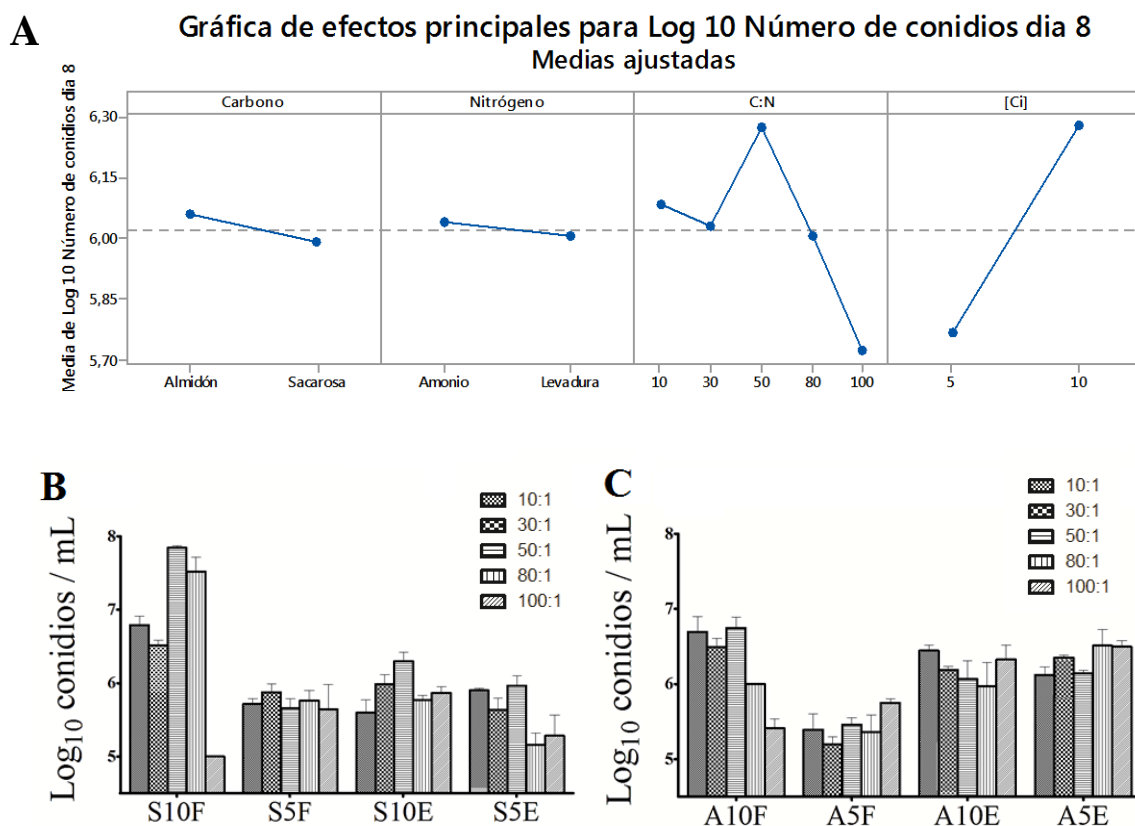


Figura 4 -2: Efecto de la fuente de carbono, concentración inicial de la fuente de carbono, fuente de nitrógeno y relación C:N en la producción de conidios de *Penicillium* sp HC1, en medio líquido¹⁵.

¹⁵ *Penicillium* sp HC1 fue cultivado a 25°C, 150 rpm durante 8 días. A. Gráfica de los efectos principales por factores y niveles para números de conidios. Producción de conidios por fuentes de carbono en B y C. B: Medios con sacarosa (S); C: medios con almidón (A). La combinación de fuente de carbono, concentración inicial y fuente de nitrógeno de cada grupo de barras corresponde a: S o A10F (Sacarosa o Almidón 10g/L, fosfato de amonio), S o A5F (Sacarosa o Almidón 5g/L, fosfato de amonio), S o A10E (Sacarosa o Almidón 10g/L, extracto de levadura), S o A5E (Sacarosa o Almidón 5g/L, extracto de levadura).

- **Viabilidad y tolerancia térmica**

Se cree que la calidad de los conidios se afecta no sólo por el tipo de fuentes sino también por las concentraciones de los nutrientes carbono y nitrógeno. Dos características de calidad de los conidios han sido definidas para este estudio: la viabilidad de los conidios, que indica la capacidad de germinación y se muestra como porcentaje de germinación; y la tolerancia térmica medida como la capacidad de germinación de los conidios después de ser sometidos a un tratamiento térmico de 50°C durante 1 hora y se muestra como porcentaje de germinación relativa. Para determinar cómo el tipo de fuente y la concentración de las fuentes pueden afectar la calidad de los conidios, se evaluó el efecto de la fuente de carbono, nitrógeno, concentración de carbono y relación C:N en la viabilidad y tolerancia de los conidios de *Penicillium* sp HC1 en medio líquido sumergido producidos al día 8 de cultivo. El análisis estadístico mostró que todos los factores evaluados, sus interacciones dobles, triples y cuádruples tuvieron un efecto significativo en la producción de conidios viables y tolerantes a un nivel de significancia del 95%. y en ambos el mayor valor F fue obtenido por el factor concentración de carbono según el análisis factorial mostrado en la Tabla 4-1.

En la Figura 4-3 se muestran los resultados del efecto de la fuente de carbono, nitrógeno, concentración de carbono y relación C:N en la viabilidad de los conidios de *Penicillium* sp HC1. En panel A se muestra la gráfica de efectos principales para el porcentaje de germinación, según el cual la mayor producción media de conidios viable por factores con sacarosa, con extracto de levadura, relación C:N 50:1 y a 10g/L. La combinación de factores en la que se obtuvo mayor porcentaje de germinación de los conidios fue usando almidón 10g/L fosfato diamónico relación C:N 10:1 (Panel C), mientras que en dos condiciones usando sacarosa 5g/L con diferentes fuentes de nitrógeno se produjeron conidios con bajo porcentaje de germinación relativo 20%, una de ellas fue a relación C:N 30:1 usando fosfato diamónico y otra fue a relación C:N 100:1 usando extracto de levadura (Panel B).

o Almidón 5g/L, extracto de levadura. Cada barra representa a una relación C: N, 10:1, 30:1, 50:1 y 100:1) según la etiqueta. La línea sobre la barra representa la desviación estándar de tres experimentos para n=3.

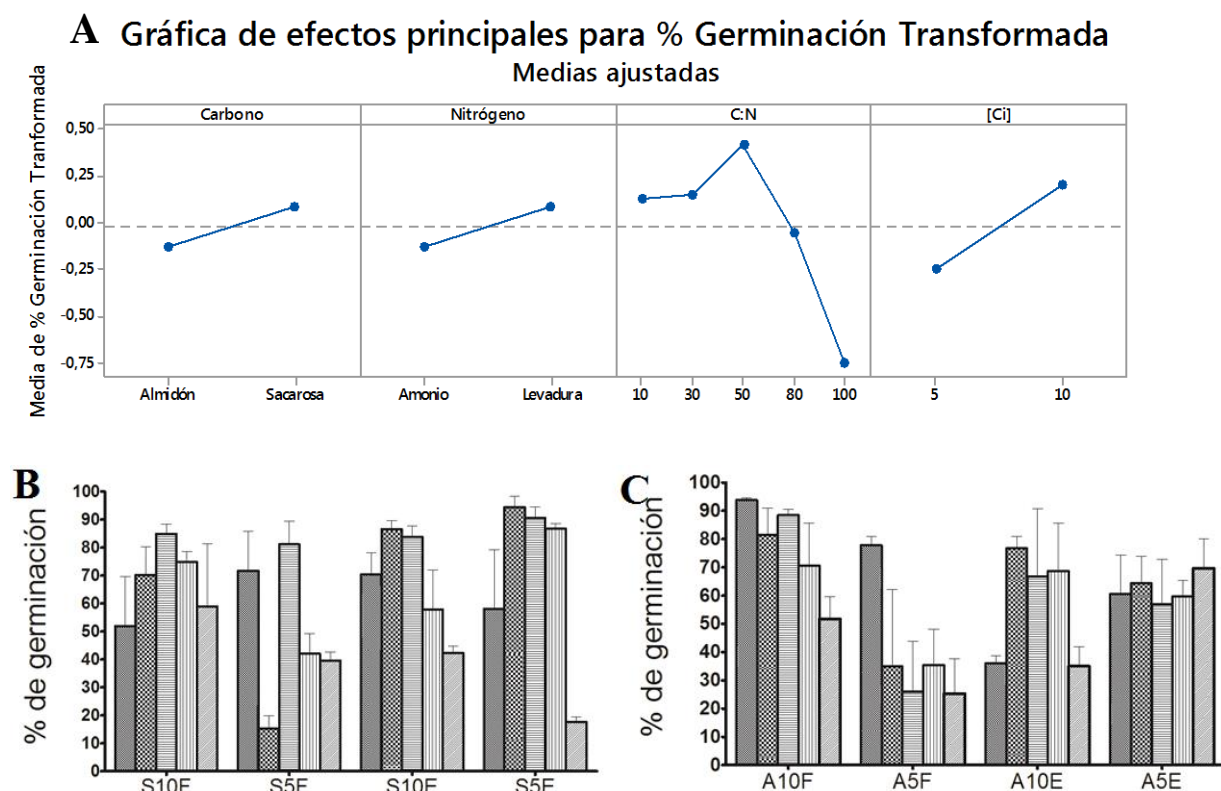


Figura 4 -3: Efecto de la fuente de carbono, concentración inicial de la fuente de carbono, fuente de nitrógeno y relación C:N en la viabilidad de conidios de *Penicillium* sp HC1, en medio líquido¹⁶.

En la Figura 4-4 se muestran los resultados del efecto de la fuente de carbono, nitrógeno, concentración de carbono y relación C:N en la tolerancia de los conidios de *Penicillium* sp HC1. En panel A, se muestra la gráfica de efectos principales para la tolerancia térmica de los conidios, según la cual la mayor producción media de conidios tolerantes a estrés térmico por fuente de carbono se obtuvo con almidón, por fuente de nitrógeno con fosfato diamónico, de las relaciones carbono nitrógeno evaluadas la mayor producción media de conidios tolerantes se obtuvo a 50:1 y de la concentraciones de carbono evaluadas la mayor producción media de

¹⁶ *Penicillium* sp HC1 fue cultivado a 25°C, 150 rpm durante 8 días. A. Gráfica de los efectos principales por factores y niveles para Viabilidad. B y C viabilidad de los conidios como porcentaje de germinación por fuentes de carbono. B Medios con sacarosa (S); en C: medios con almidón(A). La combinación de fuente de carbono, concentración inicial y fuente de nitrógeno de cada grupo de barras corresponde a: S o A10F (Sacarosa o Almidón 10g/L, fosfato de amonio), S o A5F (Sacarosa o Almidón 5g/L, fosfato de amonio), S o A10E (Sacarosa o Almidón 10g/L, extracto de levadura), S o A5E (Sacarosa o Almidón 5g/L, extracto de levadura). Cada barra representa a una relación C: N, 10:1, 30:1, 50:1 y 100:1 según la etiqueta. La línea sobre la barra representa la desviación estándar de tres experimentos n=3.

conidios tolerantes térmicos fue a 10g/L.

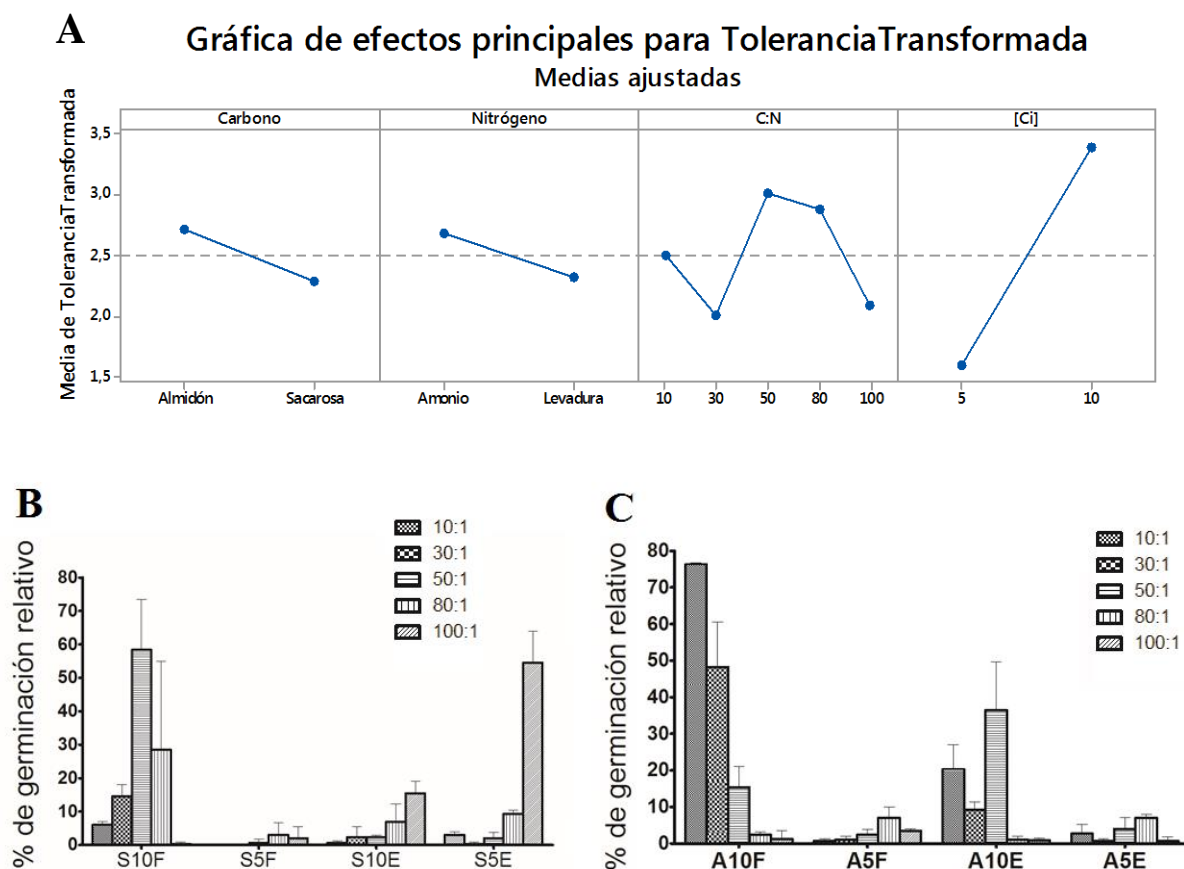


Figura 4 -4: Efecto de la fuente de carbono, concentración inicial de la fuente de carbono, fuente de nitrógeno y relación C:N en la tolerancia térmica de *Penicillium* sp HC1, en medio líquido¹⁷.

El efecto de la combinación de factores por fuente de carbono es mostrado en la figura 4-4 paneles B y C. Para sacarosa 10g/L (Panel B) un efecto sobre la tolerancia térmica de los conidios dependiente de la relación C:N fue observado cuando se usó fosfato diamónico como fuente de nitrógeno, el cual alcanzó un máximo porcentaje de germinación relativa cercano al 60% en una relación C:N 50:1. Sin embargo el efecto de positivo del aumento de la relación de C:N en la producción de conidios termo-tolerantes para esta combinación de fuentes

¹⁷ *Penicillium* sp HC1 fue cultivado a 25°C, 150 rpm durante 8 días. Gráfica de los efectos principales por factores y niveles para tolerancia térmica. B y C tolerancia térmica de conidios por fuentes de carbono. B: Medios con sacarosa (S); en C: medios con almidón(A). La combinación de fuente de carbono, concentración inicial y fuente de nitrógeno de cada grupo de barras corresponde a: S o A10F (Sacarosa o Almidón 10g/L, fosfato de amonio), S o A5F (Sacarosa o Almidón 5g/L, fosfato de amonio), S o A10E (Sacarosa o Almidón 10g/L, extracto de levadura), S o A5E (Sacarosa o Almidón 5g/L, extracto de levadura). Cada barra representa a una relación C: N, 10:1, 30:1, 50:1 y 100:1 según la etiqueta. La línea sobre la barra representa la desviación estándar de tres experimentos n=3.

desaparece a concentraciones de sacarosa de 5g/L. El efecto de la concentración de sacarosa en la producción de conidios termotolerantes cambia con la fuente de nitrógeno, cuando se evaluaron los medios de cultivos en los que se combinó sacarosa y extracto de levadura, el aumento de la relación C:N tiende a aumentar el porcentaje de germinación relativo de los conidios, sin embargo este es inferior del 20% a concentraciones de sacarosa de 10g/L. Al disminuir la concentración de sacarosa a 5g/L en combinación con extracto de levadura, el aumento de la relación C:N se relaciona con un aumento en la termotolerancia que alcanzó porcentaje de germinación relativa superiores al 50%.

En la Figura 4-4 panel B, se muestran los resultados de la combinación del tipo de fuente de nitrógeno, relación C:N y concentración de almidón en la tolerancia térmica de los conidios de *Penicillium* sp. HC1, presentados como porcentaje de germinación relativo. En este caso, a una concentración de almidón de 10 g/L, usando fosfato diamónico como fuente de nitrógeno se observó un efecto negativo del aumento de la relación C:N en la tolerancia térmica de los conidio, en la medida en que aumenta la relación C:N el % de germinación relativo de los conidios disminuye del 75% a menos del 5%. El efecto de la relación C:N sobre el porcentaje de germinación relativo de los conidios cambió cuando se evaluó la combinación de harina de almidón, extracto de levadura a concentración de 10g/L, en este caso cuando la relación C:N aumentó hasta 50:1 el porcentaje de germinación relativa también tuvo tendencia aumentar, sin embargo, este no fue superior al 50%. Cuando la concentración de harina de almidón fue de 5g/L en combinación con fosfato diamónico o extracto de levadura, el porcentaje de germinación relativa no supera el 10% para ninguna de las relaciones C:N evaluadas.

Debido a que la influencia de los factores evaluados sobre la tolerancia térmica está relacionada con las combinaciones evaluadas, a continuación se comparan los resultados presentados por Gutiérrez-Rojas y colaboradores en 2015 y los resultados obtenidos en el presente estudio.

Fuente de carbono definida y fuente de nitrógeno inorgánico: en estas condiciones la tolerancia a estrés térmico de los conidios de *Penicillium* sp HC1 en medio líquido, aumenta cuando se limita la fuente de nitrógeno pero no cuando se limita la fuente de carbono. En este estudios se comprobó que la tolerancia térmica de los conidios producidos en medios con sacarosa y fosfato diamónico, incrementa cuando se aumenta la relación C:N a concentración de sacarosa de 10g/L, estos resultados son similares a los presentados Gutiérrez-Roja y colaboradores y comparables a una combinación de fuentes de la misma naturaleza: glucosa 20g/L, nitrato de amonio. Sin embargo, un cambio en esta respuesta fue observado cuando la

concentración inicial de la fuente de carbono se redujo a 5g/L, lo que sugiere que es posible que los mecanismos asociados a tolerancia térmica en estas condiciones estén más relacionadas con el metabolismo de la fuente de carbono que con el metabolismo de la fuente de nitrógeno.

Fuente de carbono definida y fuente de nitrógeno orgánica: con esta combinación de fuentes la tolerancia a estrés térmico de los conidios de *Penicillium* sp HC1 en medio líquido, aumenta cuando se limita la fuente de nitrógeno y cuando se limita la fuente de carbono. A 10g/L de sacarosa con extracto de lavadura el máximo porcentaje de germinación relativo no superó el 20% independientemente de la relación C:N, resultados similares fueron repostados por Gutiérrez y colaboradores que encontraron que el porcentaje de germinación relativo no superó el 20% para la combinación sacarosa, extracto de levadura a concentración de 20g/L y relación carbono nitrógeno 10:1. En este caso se cree que nuevamente el metabolismo de la fuente de carbono está implicado en la característica de tolerancia térmica de los conidios de *Penicillium* sp HC1, considerando que a bajas concentraciones de carbono, las fuentes de nitrógeno orgánicas que están compuestas por hidrolizados de proteínas podrían ser usadas como fuente de carbono. En este estudio no se evaluó el consumo de la fuentes de carbono o nitrógeno durante el cultivo, pero en algunos medios con limitación de carbono o nitrógeno se observó cambios en la apariencia por la presencia de una sustancia viscosa de origen desconocido (dato no mostrado) esto sugiere que una actividad metabólica diferente ocurre en estas condiciones. Esta actividad bien podría implicar la hidrólisis de péptidos o el uso de aminoácidos como fuente de carbono. Esto ya ha sido mostrado para *Penicillium camemberti* en donde algunos aminoácidos como la lisina, arginina y glutamato dejan de ser asimilados como fuente de nitrógeno y son usados como fuente de carbono cuando se agotan la glucosa una vez se detiene el crecimiento del hongo y este entra en fase estacionaria (Adour et al. 2006; Fadila Ayati, Majda Aziza 2008) . Usando combinaciones similares de fuente de carbono y nitrógeno (glucosa e hidrolizado de caseína) Jackson y colaboradores en 1992, encontraron que al cambiar la relación C:N de estos nutrientes, la composición, germinación y factores asociados a la patogenicidad de los conidios de *Colletotrichum truncatum* cambiaban también (Jackson & Schisler 1992).

Fuente de carbono compleja y fuente de nitrógeno inorgánico: para esta combinación la tolerancia a estrés térmico de los conidios de *Penicillium* sp HC1 en medio líquido, disminuye cuando se limita la fuente de nitrógeno y de carbono. Varias combinaciones de este tipo

resultaron en porcentajes de germinación relativos de hasta el 100% en el estudio de Gutiérrez-Rojas y colaboradores, 2015. De algún modo es esperado que la limitación por ambos nutrientes en este caso tenga un efecto negativo sobre la tolerancia térmica (dado que ya se había alcanzado un porcentaje del 100% de germinación relativa). Cuando se usó almidón de 10g/L en combinación con fosfato diamónico a relación C:N 10:1 los porcentajes de germinación relativa estuvieron cercanos al 80% pero nunca llegaron al 100%, y cuando se evaluó el efecto de la limitación por nitrógeno, cambiando la relación C:N o la limitación por carbono, reduciendo la concentración de almidón a 5g/L en el medio de cultivo, esto resultó en una disminución de este porcentaje de germinación. Si bien se sabe que *Penicillium* sp HC1, tiene actividad celulolítica y xilanolítica, se desconoce su actividad amilasa. Los medios que contenían almidón fueron en los que promedio se produjo menor concentración de biomasa y por otro lado, estos medios fueron en los que en promedio se produjo un mayor número de conidios, ambos resultados sugieren que el almidón no es una fuente de carbono de fácil consumo para el hongo.

Fuente de carbono compleja y fuente de nitrógeno orgánico: la tolerancia a estrés térmico de los conidios de *Penicillium* sp HC1 producidos en medio líquido que contenían una fuente de carbono compleja y una fuente de nitrógeno orgánica, tiende a aumentar cuando se limita la fuente de nitrógeno, pero no cuando se limita la fuente de carbono. La combinación de una fuente de carbono y nitrógeno compleja como el almidón y el extracto de levadura podrían dar soporte energético para el mantenimiento celular, sin embargo la limitación de estos nutrientes en contraste parece promover la conidiogénesis pero no parece mejorar significativamente las características de tolerancia de los conidios.

Los mecanismos de como los hongos sensan los nutrientes y activan su maquinaria celular en respuesta a ellos aún no están esclarecidos. Sin embargo, en *P. roqueforti* y *P. chrysogenum* se han identificado receptores de membrana acoplados a proteína G heterotrimérica que parecen estar implicados en detectar las condiciones nutricionales y desencadenan respuestas celulares internas que controlan varios procesos del ciclo de vida asexual del hongo, entre ellos, la germinación, la respuesta a condiciones de estrés, la conidiogénesis y la producción de metabolitos (García-rico et al. 2009; García-rico et al. 2011; Carrasco-navarro et al. 2016). En relación al tipo y cantidad de nutrientes en el medio y la capacidad de los conidios de tolerar condiciones de estrés, se cree que estos mecanismos puedan estar asociados a la acumulación de polioles (Ruijter et al. 2003; Fillinger et al. 2001; Hagiwara et al. 2014), la acumulación y arreglos de proteína tipo hidrofobinas en la pared celular (Li, Shi, Ying, & Feng, 2015; Ying &

Feng, 2004) o la activación de proteínas del choque térmico (Nevarez et al. 2008).

4.2 Cambios en la superficie de la pared celular de los conidios de *Penicillium* sp. HC1 y su relación con la tolerancia térmica

Se seleccionaron cuatro medios de cultivos en los que se produjo el mayor porcentaje de germinación relativo por combinación de fuente de carbono y fuente de nitrógeno: S5-E100, S10-F50, A10-E50 y A10-F10; para comparar las características de los conidios producidos en estos medios, se seleccionaron otros cuatro en los que el porcentaje de germinación relativo fue bajo usando la misma combinación de fuente de carbono y nitrógeno pero en los que varió la concentración o relación C:N de las fuentes estos fueron : S10-E10, S5-F10, A5-E50 y A5-F10.

4.2.1 Perfil de germinación de los conidios *Penicillium* sp HC1 en medios donde se producen conidios con diferente tolerancia a condiciones de estrés térmico

Previo a la evaluación de las características microscópicas de los conidios y la superficie de la pared se observó el perfil de germinación de los conidios inoculados en cada uno de los ocho medios de cultivo seleccionados. En la Figura 4-5 se muestran los resultados del perfil de germinación de los conidios de *Penicillium* sp. HC1 y Figura 4-6 se muestra una imagen representativa de los conidios germinados a las 12 y 30 horas de cultivo para cada medio evaluado.

En la Figura 4-5 panel A, se muestra el perfil de germinación de los conidios inoculados en los medios líquidos que contenían sacarosa como fuente de carbono y extracto de levadura como fuente de nitrógeno, el medio en donde se produjeron conidios termo-tolerantes S5-E100 y el medio donde se produjeron conidios no termo-tolerantes S10-E10. Se observó que para ambos medios durante las 12 primeras horas de cultivo el porcentaje de germinación de los conidios inoculados fue menor del 20%, entre las 12 y las 30 horas ocurrió el mayor incremento en el porcentaje de germinación y aproximadamente el 80% de los conidios había germinado a las 30 horas de cultivo, sin embargo hubo diferencias significativas en el porcentaje de conidios germinados a las 24 horas, entre los dos medios de cultivo, en donde el medio S10-E10 alcanzó el mayor porcentaje de germinación. En la Figura 4-6 panel A, se muestran las estructuras formadas durante el proceso de germinación a la hora 12 y 30 para los medios S5-

E100 y S10-E10. A las 12 horas en ambos medios se observaron conidios en diferente estado de germinación. En el medio S5-E100 a la hora 30 se observaron conidios con tubos germinales polares completamente desarrollados o en desarrollo, hifas en anastomosis, ramificadas y conidios sin germinar, no se observaron estructuras de conidiogénesis a la hora 30. En el medio S10-E10 a la hora 30 se observaron tubos germinales gruesos con algún grado de diferenciación, aunque no se observaron fiálides bien definidas o conidióforos, hifas completamente desarrolladas, ramificadas y conidios sin germinar.

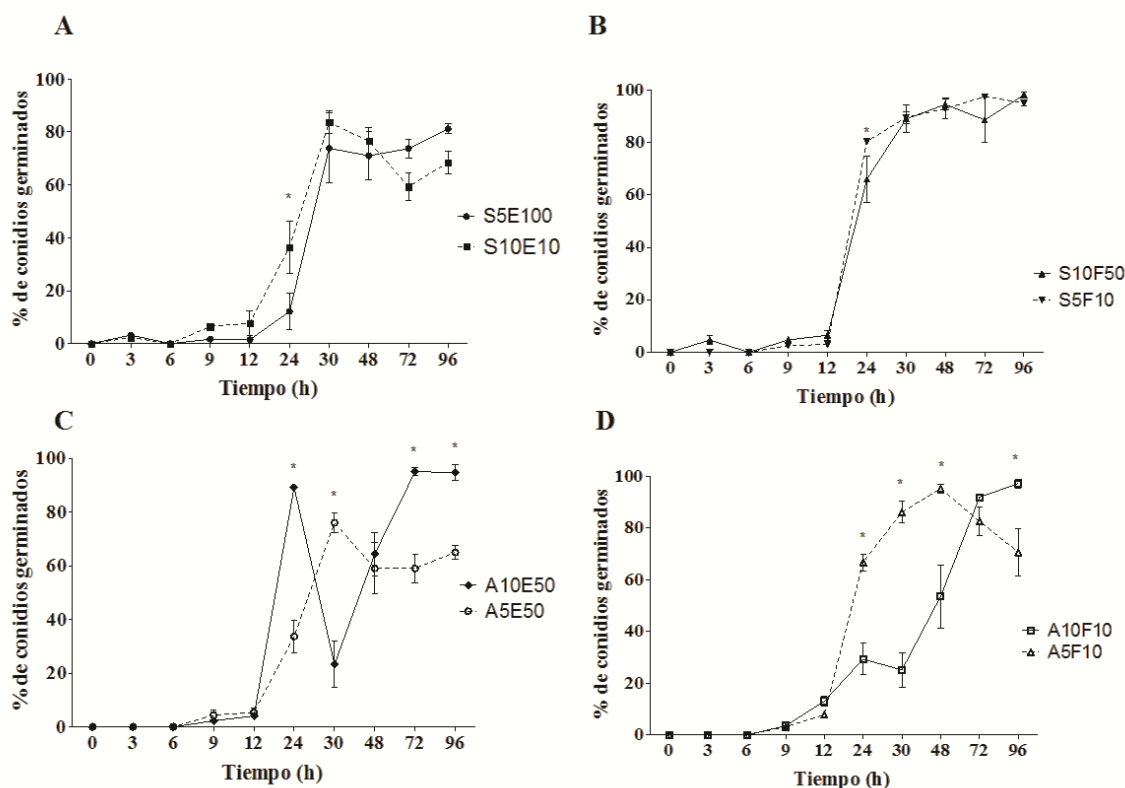


Figura 4-5: Perfil de germinación de conidios de *Penicillium* sp HC1 inoculados en medios que producen conidios con diferente tolerancia a estrés térmico¹⁸.

El perfil de germinación de los conidios inoculados en los medios que contenían sacarosa como

¹⁸ Perfil de germinación de los conidios de *Penicillium* sp HC1, hasta la 96 horas de cultivo en medio líquido. Los medios de cultivo fueron mantenidos a 25°C y 150 rpm, la composición del medio es mostrada en: A: Medios Sacarosa- Extracto de Levadura, S5-E100 y S10-E10; B: Medios Sacarosa-Fosfato diamónico, S10-F50 y S5-F10; C: Medios Almidón- Extracto de levadura, A10-E50 y A5-E50; D: Medios Almidón y Fosfato diamónico: A10-F10 y A5-F10. La línea continua representan el medio de producción de conidios de alta tolerancia térmica y la línea inter-punteada al medio donde se producen conidios de baja tolerancia térmica. Las barras sobre los puntos representan la desviación estándar. Un asterisco (*) es mostrado en el tiempo en que hubo diferencias significativas a un 95% ($p < 0.05$).

fuelle de carbono y fosfalo diamónico como fuente de nitrógeno (S10-F50 y S5-F10) se muestra en la Figura 4-5 panel B. Se observó que durante las 12 primeras horas de cultivo el porcentaje de germinación de los conidios inoculados fue menor del 20%, entre las 12 y las 24 horas ocurre el mayor incremento en el porcentaje de germinación y aproximadamente el 80% de los conidios ha germinado a las 24 horas en donde existen diferencias significativas en el porcentaje de conidios germinados a las 24 horas. En este caso el medio donde se produjeron conidios de baja tolerancia S5-F10, alcanzó el mayor porcentaje de germinación cercano al 100%.

En la Figura 4-6 panel B, se muestran las estructuras formadas durante el proceso de germinación a las horas 12 y 30 para los medios S10-F50 y S5-F10. A las 12 horas en ambos medios se observaron conidios en diferente estado de germinación formando un tipo de conglomerado. A la hora 30 en ambos medios (S5-E100 y S10-E10) se observaron conidios conglomerados, germinados con tubos germinales polares completamente desarrollados o en desarrollo, hifas en anastomosis, ramificadas y conidios sin germinar, no se observaron estructuras de conidiogénesis a la hora 30.

El perfil de germinación de los conidios inoculados en los medios que contenían almidón como fuente de carbono y extracto de levadura como fuente de nitrógeno (A10-E50 y A5-E50) se muestra en la Figura 4-5 panel C. Se observó que durante las 12 primeras horas de cultivo el porcentaje de germinación de los conidios inoculados fue menor del 20%, en ambos medios. Entre las 12 y las 24 horas ocurre el mayor incremento en el porcentaje de germinación (80%) en el medio A10-E50, que se redujo a casi un 20% a la hora 30 y alcanzó nuevamente un porcentaje de germinación cercano al 80% a la hora 72. Para el medio A5-E50, se observó que entre las 12 y las 30 horas ocurre el mayor incremento en el porcentaje de germinación y aproximadamente el 80% de los conidios ha germinado a la 30. A partir de la hora 24 hubo diferencias significativas en el porcentaje de conidios germinados entre ambos medios. En este caso el medio de alta tolerancia A10-E50, alcanzó el mayor porcentaje de germinación. En la Figura 4-6 panel C, se muestran las estructuras formadas durante el proceso de germinación a la hora 12 y 30 para los medios A10-E50 y A5-E50. A las 12 horas en ambos medios se observaron conidios en diferente estado de germinación. En el medio A10-E50 a la hora 30 se observaron conidióforos microcíclicos con cadenas de conidios nuevos emergentes, conidios con tubos germinales polares completamente desarrollados o en desarrollo, hifas en anastomosis, hifas ramificadas y conidios sin germinar. En el medio A5-E50 a la hora 30 se observaron hifas en proceso de diferenciación y fiálides, conidios con tubos germinales polares,

hifas completamente desarrolladas, ramificadas y conidios sin germinar.

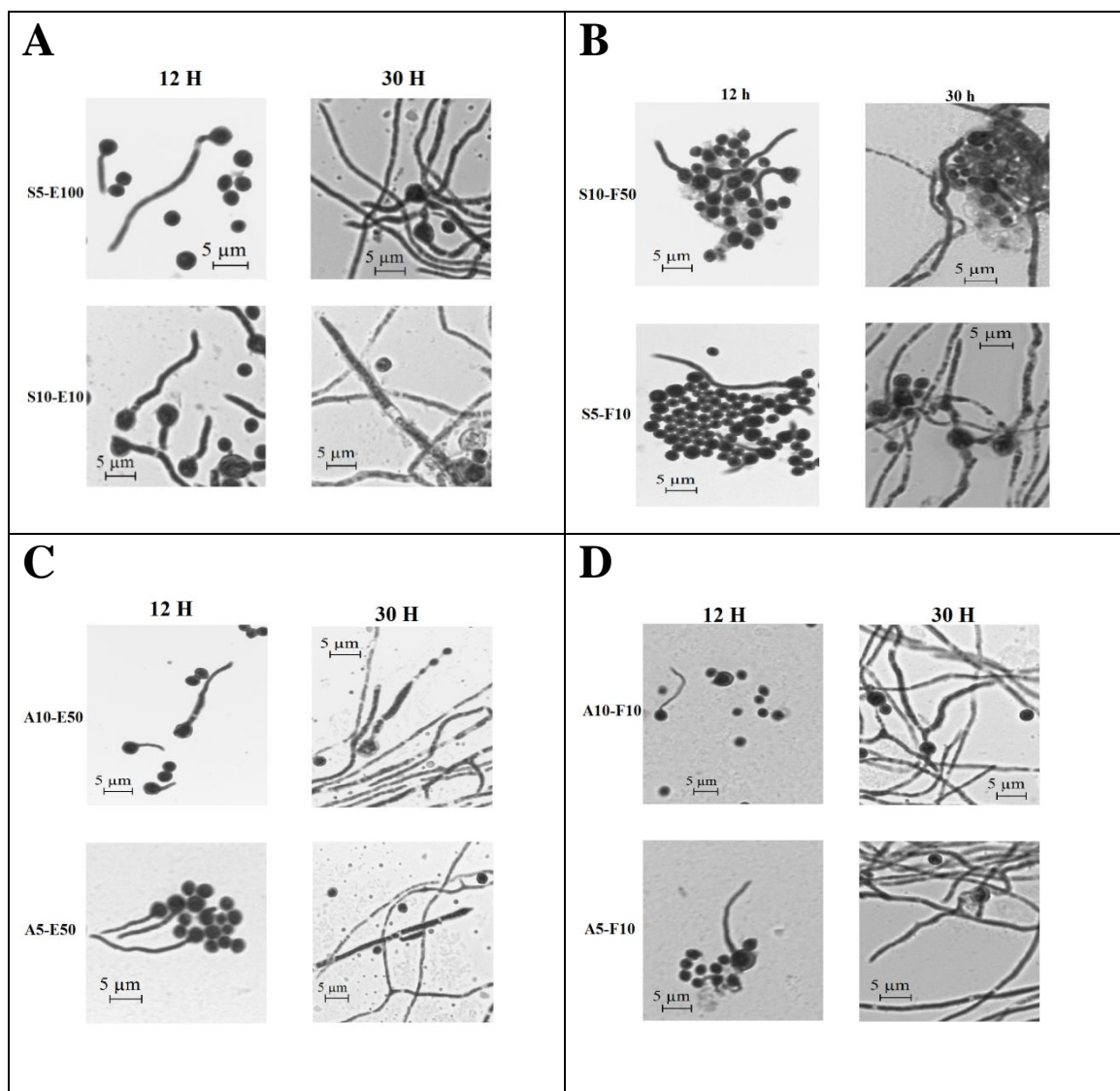


Figura 4 -6: Perfil de germinación de conidios de *Penicillium* sp HC1 inoculados en medios que producen conidios con diferente estrés térmico¹⁹.

El perfil de germinación de los conidios inoculados en los medios que contenían almidón como

¹⁹ Microfotografías de los cultivo de *Penicillium* sp HC1, a las 12 y 30 horas de inoculación, los medios de cultivo en estado líquido fueron mantenidos a 25°C y 150 rpm, la composición del medio en mostrada en A: Medios Sacarosa- Extracto de Levadura, S5-E100 y S10-E10; B: Medios Sacarosa-Fosfato diamónico, S10-F50 y S5-F10; C: Medios Almidón- Extracto de levadura, A10-E50 y A5-E50; D: Medios Almidón y Fosfato diamónico: A10-F10 y A5-F10. Las fotografías fueron tomadas en microscopio óptico a 100x. La barra de escala en las microfotografías corresponden a 5 µm.

fuelle de carbono y fosfalo diamónico como fuente de nitrógeno (A10-F10 y A5-F10) se muestra en la Figura 4-3 panel C. Se observó que durante las 12 primeras horas de cultivo el porcentaje de germinación de los conidios inoculados fue menor del 20%, en ambos medios. Para el medio A10-F10 el máximo porcentaje de germinación se alcanzó a las 96 horas y fue cercano al 100%. Para el medio A5-F10, el máximo porcentaje de germinación se alcanzó a las 48 horas y fue cercano al 100%. A partir de la hora 24 hubo diferencias significativas en el porcentaje de conidios germinados entre ambos medios. En la Figura 4-4 panel D, se muestran las estructuras formadas durante el proceso de germinación a la hora 12 y 30 para los medios A10-F10 y A5-F10. A las 12 horas en ambos medios se observaron conidios en diferente estado de germinación. A la hora 30, en ambos medios (A10-F10 y A5-F10) se observaron conidios con tubos germinales polares completamente desarrollados o en desarrollo, hifas en anastomosis, ramificadas y conidios sin germinar, no se observaron estructuras de conidiogénesis.

El proceso de germinación de conidios en medio líquido ha sido caracterizado para varias especies del género *Penicillium*, Fletcher & Morton indicaron que los requerimientos de fuente de carbono o nitrógeno puede ser específico de cada especie y en consecuencia no podrían hacerse generalizaciones ya que ellos encontraron que para conidios de *Penicillium griseofulvum* mostraron un requerimiento absoluto de glucosa para iniciar la germinación, mientras que otras especies podían germinar en medios con sacarosa u otra fuente de carbono (Fletcher & Morton 1970). Con relación a otros requerimientos, Martin y colaboradores, encontraron que el total de los conidios de *Penicillium notatum* observados a las 36 horas de cultivo germinaron en medios con sacarosa como fuente de carbono y todas las fuentes de nitrógeno evaluadas: sales de amonio, nitrato de sodio e hidrolizados de caseínas favorecieron la germinación; la germinación no fue dependiente de factores de crecimientos ni vitaminas y ocurrió a un pH óptimo de 6 (Martin et al. 1973).

En este estudio, se encontró que en todos los casos al comparar el perfil de germinación de los conidios de *Penicillium* sp HC1, inoculados en los medios de cultivos donde se obtuvieron conidios de alta o baja tolerancia térmica, se encontraron puntos en los que hubo diferencias estadísticamente significativas. En el caso de los medios con sacarosa, los medios de baja tolerancia alcanzaron porcentajes de germinación más alto y en menor tiempo que los medios de alta tolerancia. Sin embargo en los medios en los que se usó almidón como fuente de carbono no se puede establecer esta asociación, aunque se encontraron diferencias entre los perfiles de germinación de los conidios entre cada medio comparado.

García-Rico y colaboradores sugieren que asociada a la membrana de los conidios de *Penicillium chrysogenum* se encuentran receptores que sensan el tipo de fuente de carbono y esto activa la germinación de los conidios por una vía de señalización celular aún no esclarecida; sin embargo ellos indican que, la fuente de nitrógeno no tiene ningún papel en el proceso de germinación para este hongo, ya que los conidios no germinaron en agua destilada con 0.3% NaNO_3 y su adición o ausencia no cambió significativamente los porcentajes de germinación obtenidos en medio Czapek, sin fuente de carbono (García-rico et al. 2011). Aunque en el presente estudio no se evaluó el papel de la fuente de carbono o nitrógeno en el proceso de germinación de los conidios de *Penicillium* sp. HC1, se encontró que la perfil de germinación cambia cuando fuentes de carbono complejas como la harina de almidón son combinadas con diferentes fuentes de nitrógeno y es posible que para *Penicillium* sp. HC1, este efecto también puede estar influenciado por la concentración de carbono y la relación C:N.

La aparición temprana de estructuras de conidiación en los medios A10E50 Y A5E50 sugieren que no solo la fuente de carbono, juega un papel en el proceso de germinación de *Penicillium* sp. HC1, sino que también el tipo de fuente de nitrógeno, la concentración inicial de carbono y la relación C:N están implicados en este proceso. Por lo tanto, se cree que la capacidad del hongo de sensar los cambios en el entorno nutricional (Jackson & Schisler 1992), desde la germinación, activan respuestas celulares diferentes, que contribuyen a la formación de conidios con características diferentes los cuales puedan estar relacionados con el atributo de calidad tolerancia térmica observado en los conidios recolectados al día 8.

Con la caracterización microscópica del proceso de germinación de los conidios inoculados, se logró determinar que a las 96 horas (día 4 de cultivo) la gran mayoría de los conidios inoculados habían germinado y que por lo tanto los conidios obtenidos al día 8 de cultivo, muy probablemente corresponden a conidios nuevos y sus características estén relacionadas con el medio en el que se produjeron.

4.2.2 Caracterización microscópica de los conidióforos de *Penicillium* sp. HC1 según los medios en donde se producen conidios tolerantes a estrés térmico

Los conidióforos encontrados al día ocho de cultivo fueron comparados para cada par de medios seleccionados según la producción de conidios tolerantes a estrés térmico y de acuerdo a la combinación del tipo de fuente de carbono y nitrógeno posible. En total ocho medios de cultivo

fueron comparados. En la Figura 4-7 se muestran las características microscópicas de los conidióforos para los medios que contenían sacarosa como fuente de carbono, en el panel A se presentan los resultados para la combinación sacarosa- fosfato diamónico. En la microfotografías se observa que para el medio de cultivo donde se producen conidios tolerantes a estrés térmico, en el medio S10-F50, predominaron conidióforos poco complejos con una fiálide y ramificaciones subapicales, en este medio también se encontraron otros tipos de conidióforos, monoverticilados y bifurcados al comparar estos conidióforos con los encontrados en el medio donde se producen conidios no tolerantes a estrés térmico se encontraron cuatro tipos de conidióforos con mayor nivel de ramificaciones y número de fiálides. Las medidas micrométricas del ancho del número de fiálides y el número de fiálides mostraron diferencias estadísticamente significativas según un análisis de t-studen para 2 muestras realizadas con el programa Minitab versión 17.0 Mostrado en Anexos O.

Al comparar los tipos de conidióforos encontrados en los medios seleccionados en los que se combinaba sacarosa-extracto de levadura, se observó que el tipo de conidióforo que prevalece en ambos medios contiene una sola fiálide, sin embargo las microfotografías y las medidas micrométricas del largo y ancho de las fiálides muestran que hay diferencias entre los conidióforos hallados en cada medio de cultivo. En el medio donde se producen conidios termotolerantes, el medio S5-E100, predominaron conidióforos sencillos conformados por fiálides solitarias que presentaron un largo menor de 5 micras y un ancho de las fiálides menor de 0.5 micras, mientras que los conidióforos encontrados en el medio donde se producen conidios de baja tolerancia térmica, el medio S10-E10, también predominaron conidióforos poco complejos con una fiálide pero estos presentan ramificaciones subapicales, el largo de estos conidióforos fue de 10 micras y el ancho de las fiálides mayor de 2 micras estas diferencias fueron estadísticamente significativas.

En la Figura 4-8 se muestra la caracterización microscópica de los medios que contienen harina de almidón, en el panel A, se presentan los resultados para la combinación harina de almidón- fosfato diamónico. En el medio de cultivo A10-F10 (donde se encontraron conidios termotolerantes) se observaron conidióforos monoverticilados de dos fiálides y fiálides solitarias mientras que en el medio A5-F10 (donde se produjeron conidios de baja tolerancia térmica) se encontraron cinco tipo de conidióforos desde fiálides solitarias hasta cuatriverticilados, este último representa uno de los conidióforos con mayor grado de ramificación y complejidad. Se encontraron diferencias significativas en el largo de los conidióforos, el ancho de las fiálides y

el número de fiálides entre los conidióforos caracterizados en estos dos medios.

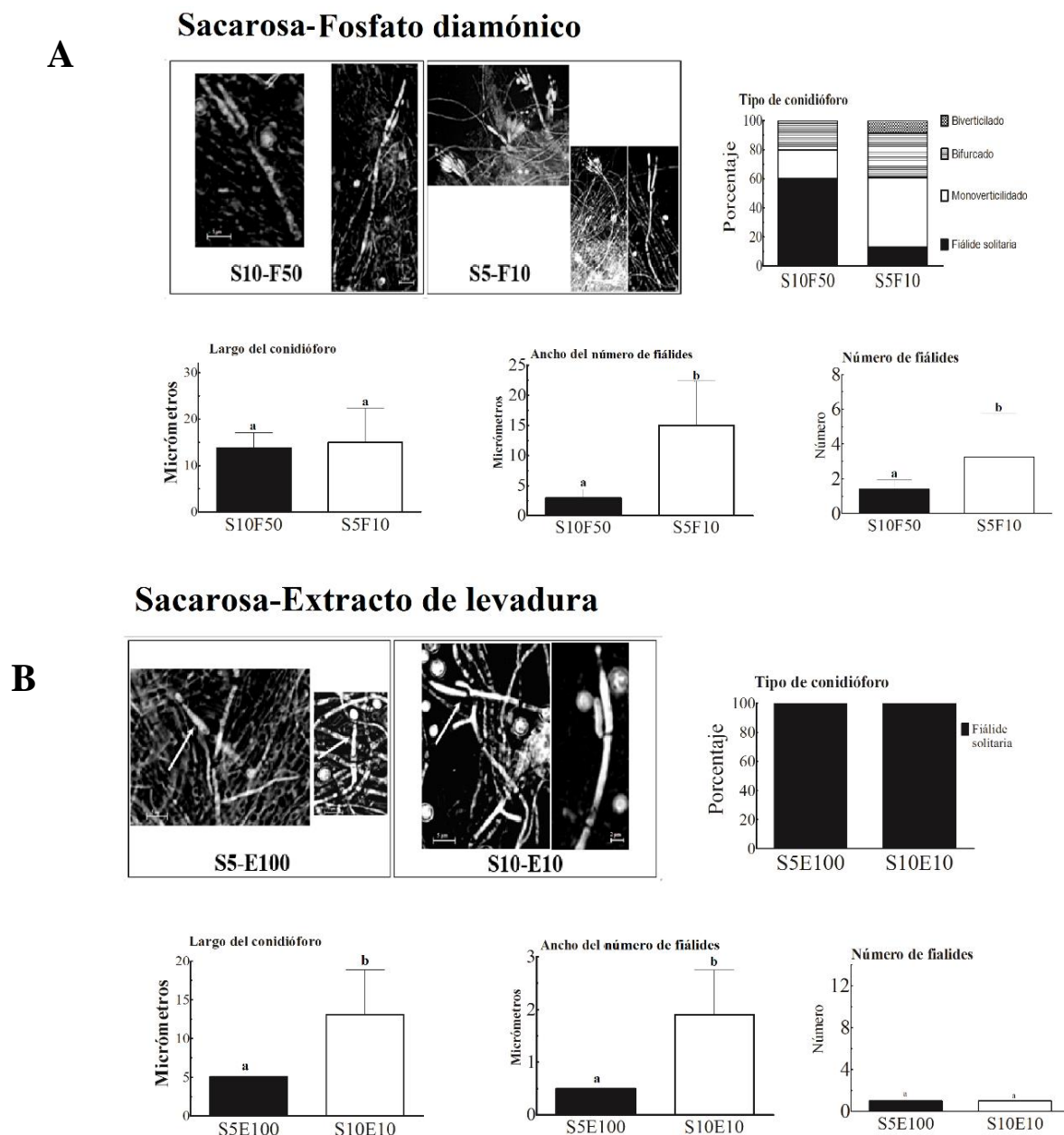


Figura 4 -7: Conidióforos de *Penicillium* sp HC1 en medios seleccionados por producir conidios con diferente tolerancia térmica que contienen sacarosa²⁰.

²⁰ *Penicillium* sp HC1 fue cultivado a 25°C, 150 rpm durante 8 días en medio líquido. A. Medios Sacarosa-fosfato diamónico. B Medios Sacarosa- extracto de levadura. Se muestran Microfotografías, tipo de conidióforos, largo del conidióforo, ancho del número de fiálides y número de fiálides. Las líneas en delgadas en la mitad de las barras representa la desviación estándar y las letras corresponden a los subconjuntos para $p=0.05$ de una prueba t.studen. Letras diferentes indican que hay diferencias.

En la Figura 4-8 panel B, se muestran los resultados para los medios en los que se combinó harina de almidón-extracto de levadura y se encontraron tres tipos de conidióforos, fiálides solitarias, monoverticilados y biverticilados en el medio de cultivo A10-E50, medio en el que se producían conidios con tolerancia térmica, sin embargo en el medio A5-E50, en el cual los conidios producidos presentaban baja tolerancia a estrés térmico, se encontraron cinco tipos de conidióforos que variaron de fiálides solitaria a triverticilados. Al comparar las medidas micrométricas del largo de los conidióforos, ancho del número de fiálides y el número de fiálides no se encontraron diferencias significativas.

Gutiérrez-Rojas y colaboradores, mostraron previamente que existe una correlación positiva y estadísticamente significativa, entre las características morfológicas de los conidióforos y la tolerancia a un tratamiento térmico de 50 °C por 1 hora de los conidios producidos en diferentes condiciones de cultivo, el análisis sugiere que los conidios obtenidos de estructuras más grandes tienden a ser más tolerantes, sin embargo Gutiérrez-Rojas y colaboradores también indican que esta relación no siempre es directa y no depende sólo de una condición, como el estado del medio o los tipos de fuente de carbono o nitrógeno, sino más bien de la interacción de muchos factores (Gutiérrez-Rojas et al. 2015). En ese sentido, en este estudio se compararon los conidióforos de *Penicillium* sp HC1 encontrados al octavo día de cultivo y esta comparación estuvo delimitada por la combinación del tipo de fuente de carbono y nitrógeno en condiciones en las que en algunos casos cambió solo la concentración inicial de carbono o la relación carbono nitrógeno o ambas. Los resultados de este estudio mostraron que para el caso de los medios que fueron seleccionados porque en ellos *Penicillium* sp HC1 produjo el mayor porcentaje de conidios tolerantes a estrés térmico, los conidióforos se caracterizaron por ser de menor complejidad que su par contrario, es decir, los conidióforos producidos en medios seleccionados por su baja tolerancia a estrés térmico. En los medios en los que se usó sacarosa como fuente de carbono, en los medios en los que se producían conidios termo-tolerantes se observó que las condiciones que incluían limitación por nitrógeno independientemente de la fuente de nitrógeno se asociaron a la presencia de conidióforos de menor complejidad y en el caso de los conidióforos encontrados en los medios donde se usó harina de almidón como fuente de carbono y que estaban asociados a la producción de conidios termo tolerantes se observó que existía una condición de limitación por carbono. Esto pone en evidencia que existe un complejo pero sensible sistema por medio del cual el hongo sensa su entorno nutricional que va incluso a la detección de las cantidades y relación de los nutrientes carbono y nitrógeno.

Se cree que existe una relación entre el ambiente nutricional que es detectado por el hongo, la activación de la conidiogénesis y la tolerancia de los nuevos conidios a condiciones de estrés. La formación del conidióforo marca el inicio de la etapa de conidiogénesis en el ciclo de vida de los hongos filamentosos y está controlada por una vía reguladora central formada por los genes *brlA*, *abaA* y *wetA*. (H.-S. Park and J.-H. Yu et al. 2016). García-Rico y colaboradores propusieron una ruta de señalización mediada por la sub unidad alfa de la Proteína G Heterotrimérica acoplada a receptores de membrana de Proteína G (Pga1) como efector intracelular que regula negativamente ambos procesos: la expresión de *brlA* y *wetA* asociados a la formación del conidióforo en *P. chrysogenum* y la tolerancia a condiciones de estrés (térmico, osmótico y por detergentes aniónicos) donde la señal medio ambiental que promueve esta respuesta se relaciona con las fuentes de carbono. (García-Rico et al. 2008; García-rico et al. 2011). Sin embargo, estos estudios no muestran una correlación entre la complejidad del conidióforo y la tolerancia a las condiciones de estrés mencionadas. Carrasco-Navarro y colaboradores, proponen un modelo mas complejo sobre la implicacion de Pga1 en la regulacion de difrentes estados del desarrollo de *P. chrysogenum*, y las señales ambientales asociadas podrían implicar la fuente de carbono y otras señales ambientales(Carrasco-Navarro et al., 2016).

M. Wang et al., mostraron que mutantes de *Penicillium digitatum* en los que se delecionó el gen *Pd-brLA*, se bloqueó la formación de conidióforos, mientras que en los mutantes del gen *Pd-abaA* se formaron fiálides aberrantes y no funcionales, el mutante *Pd-wetA* mostró varios fenotipos defectuosos, tales como conidios anormales con paredes celulares flojas, germinación retardada y tolerancia reducida a tensiones osmóticas, tratamiento con detergente, choque térmico y a tratamientos con menadiona (antifungico), pero elevada resistencia a H₂O₂ (Wang et al. 2015). Los resultados de Wang y colaboradores sugieren que los genes *brlA*, *abaA* y pero sobretodo *wetA* desempeñan un papel primordial en las características de los nuevos conidios y su capacidad de tolerar condiciones de estrés ambiental.

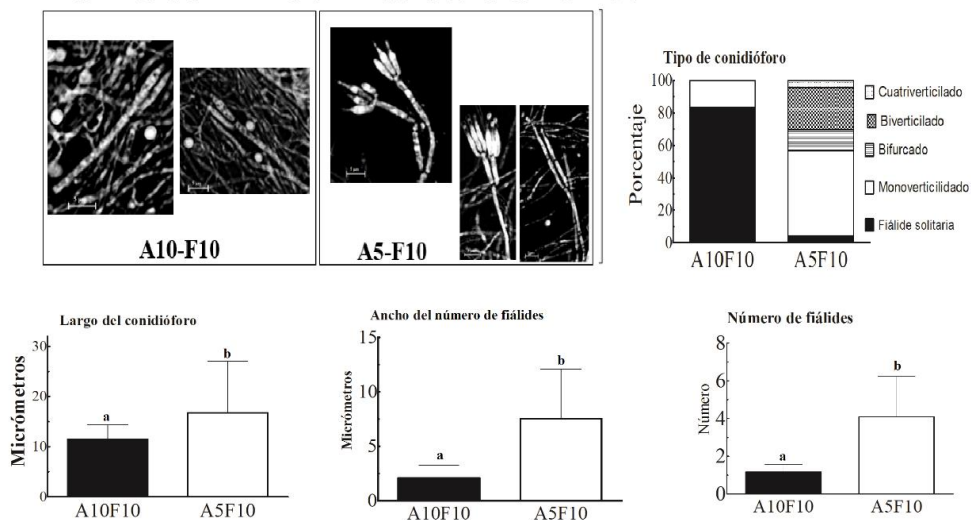
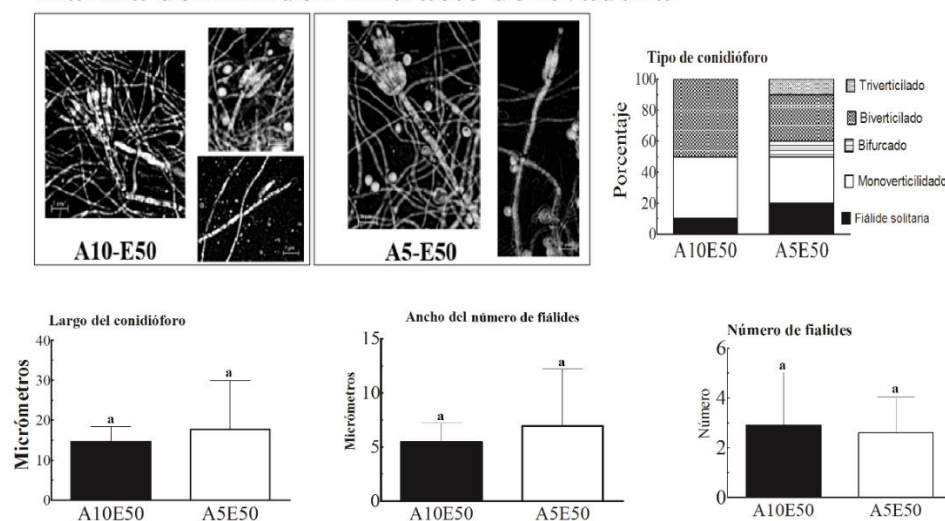
A**Harina de Almidón-Fosfato diamónico****B****Harina de Almidón-Extracto de levadura**

Figura 4 -8: Conidióforos de *Penicillium* sp HC1 en medios seleccionados por producir conidios con diferente tolerancia térmica que contienen harina de almidón²¹

²¹ *Penicillium* sp HC1 fue cultivado a 25°C, 150 rpm durante 8 días en medio líquido. A. Medios Harina de almidón-fosfato diamónico. B. Medios Harina de almidón- extracto de levadura. Se muestran Microfotografías, tipo de conidióforos, largo del conidióforo, ancho del nro de fiálides y numero de fiálides. Las líneas en delgadas en la mitad de las barras representa la desviación estándar y las letras corresponden a los subconjuntos para p=0.05 de una prueba t.studen. Letras diferentes indican que hay diferencias.

3.1.1 Cambios de la superficie de la pared celular de los conidios de *Penicillium* sp. HC1 con tolerancia diferencial a condiciones de estrés térmico.

La superficie de los conidios de *Penicillium* sp HC1 fue obtenida por microscopia electrónica de barrido y las medidas del largo, ancho y relación largo ancho fueron realizadas a los conidios obtenidos del mismo cultivo observados al azar por microscopia óptica. En la Figura 4-9 se muestra la caracterización microscópica de los conidios de *Penicillium* sp HC1 producidos en PDA (Agar papa dextrosa). Los conidios producidos en este medio fueron usados como referente ya que estos fueron usados como inóculo, al octavo día de cultivo todo el micelio del hongo ha conidiado de forma homogénea y estos conidios alcanzaron una tolerancia térmica cercana al 20%. Según la clasificación del tipo de ornamento propuesto por Martínez y colaboradores (Tabla 2-1 y Figura 2-15), los conidios obtenidos en PDA presentaron arreglos estriados con crestas irregulares bajas y escasas que forman patrones cerebroidiformes (Figura 4-9- A). El largo y ancho de estos conidios osciló entre 2 y 3.25 micras (Figura 4-9 -B).

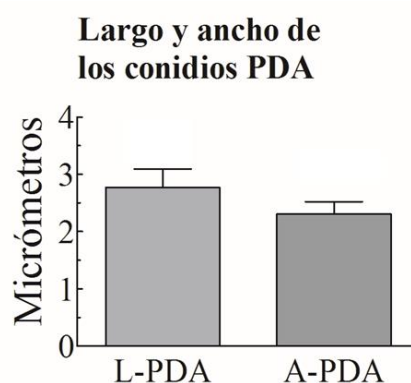
A**B**

Figura 4 -9: Características microscópicas de los conidios de *Penicillium* sp HC1 en Agar Papa Dextrosa²².

En la Figura 4-10 se muestra los resultados de las características microscópicas de los conidios obtenidos en los medios de cultivos seleccionados por su tolerancia térmica que contenían sacarosa. En el panel A, la superficie de los conidios observados por microscopia electrónica

²² *Penicillium* sp HC1 fue cultivado a 25°C, 150 rpm durante 8 días en medio líquido. A Microfotografía de barrido electrónico. B. Largo y anchos de los conidios

de barrido mostraron que los conidios producidos con la combinación sacarosa-fosfato diamónico eran globosos con arreglos cerebroidiforme, el largo y ancho así como la relación largo y ancho de los conidios obtenidos en los medios S10-F50 y S5-F10 no presentaron diferencias. En el panel B se muestran las características de los conidios producidos en los medios seleccionados por su tolerancia térmica que correspondían a la combinación sacarosa-extracto de levadura. En ambos medios los arreglos estriados con crestas irregulares altas fueron observados, sin embargo en el medio S10-E10, donde se produjeron conidios de baja tolerancia térmica, los conidios eran más globosos, grandes y con estrías más anchas. Al comparar el largo y ancho de los conidios producidos en los medios S5-E100 y S10-E10 se encontraron diferencias significativas pero no en la relación largo y ancho.

En la Figura 4-11 se muestran los resultados de la caracterización microscópica de los conidios obtenidos en los medios que contenían harina de almidón que fueron seleccionados por su tolerancia térmica. En este caso para los medios en los que se combinó harina de almidón-fosfato diamónico (panel A) también se encontró un patrón cerebroideforme con arreglos más gruesos para el conidio del medio S5-F10, donde se produjeron conidios de baja tolerancia térmica. No se encontraron diferencias entre el largo ancho relación largo y anchos entre los conidios producidos en los medios A10-F10 y A4-F10. Para los conidios producidos en los medios en los que se usó extracto de levadura (panel B) los mismos patrones cerebroides fueron observados y la misma tendencia de crestas más gruesas presentes en el medio A5-E50 donde se produjeron conidios de baja tolerancia térmica. Sin embargo no hubo diferencias entre el largo, ancho y relación largo ancho de los conidios obtenidos en los medios A10-E50 y A5-E50.

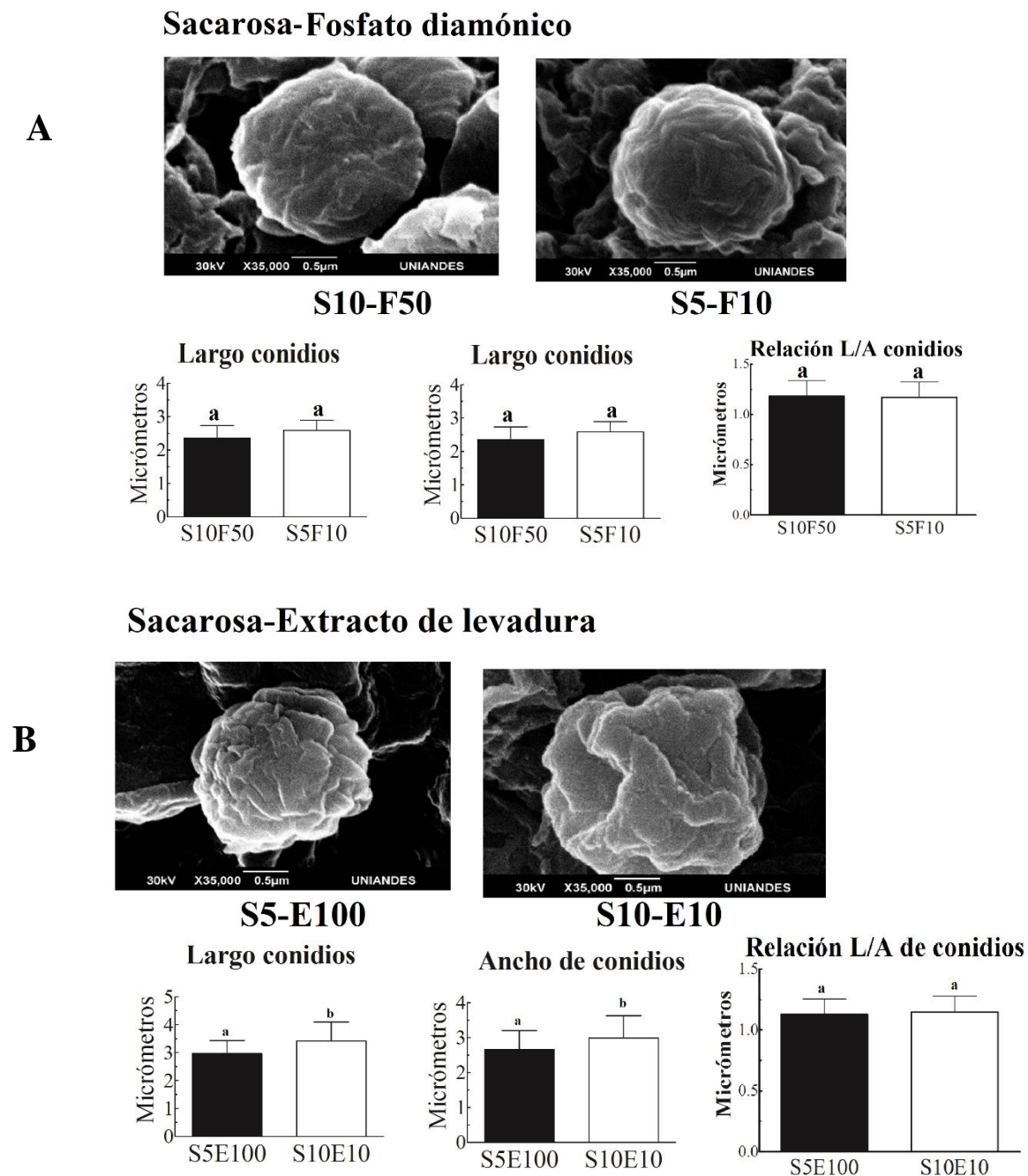


Figura 4 -10: Características microscópicas de los conidios de *Penicillium* sp HC1 producidos en medios con sacarosa²³.

²³ *Penicillium* sp HC1 fue cultivado a 25°C, 150 rpm durante 8 días en medio líquido. A. Conidios producidos en medios con sacarosa-fosfato diamónico B. Conidios producidos en medios con sacarosa-extracto de levadura. Microfotografía de barrido electrónico. Largo y anchos de los conidios

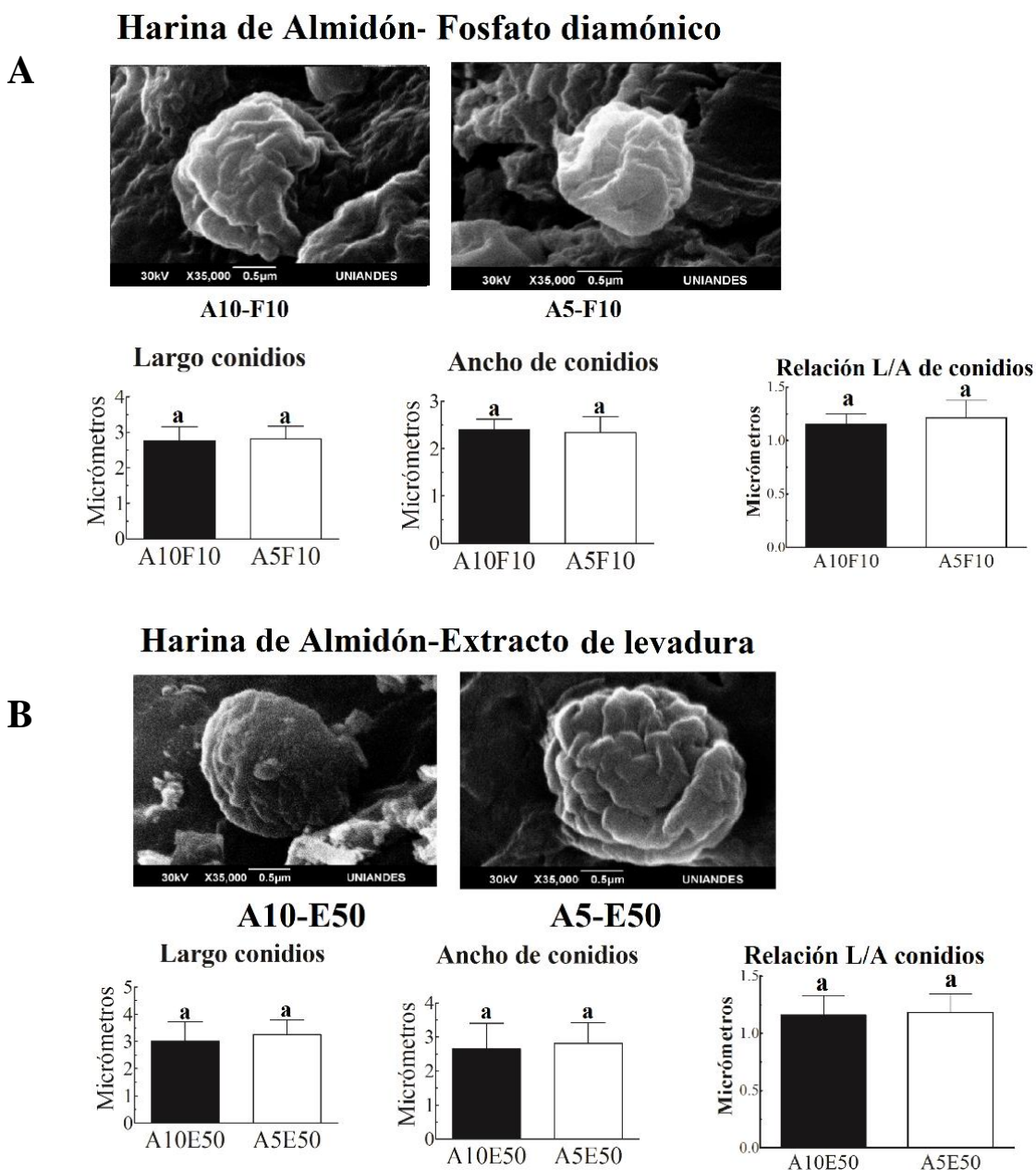


Figura 4 -11: Características microscópicas de los conidios de *Penicillium* sp HC1 en medios con harina de almidón²⁴.

²⁴ *Penicillium* sp HC1 fue cultivado a 25°C, 150 rpm durante 8 días en medio líquido. A. Conidios producidos en medios con harina de almidón-fosfato diamónico B. Conidios producidos en medios con harina de almidón-extracto de levadura. Microfotografía de barrido electrónico. Graficas de Largo, anchos de los conidios y relación largo ancho.

Es evidente que la composición del medio de cultivo influye en los patrones de agregación y ornamentos de los conidios de *Penicillium* sp. HC1, sin embargo no se puede establecer una clasificación para cada conidio según sus ornamentos y su relación con la tolerancia térmica ya que se desconoce si las imágenes obtenidas correspondían a un conidio tolerante o no tolerante. Cuando Hess y colaboradores encontraron patrones de agregación diferentes en el cultivo de una misma especie, sugirieron que estas diferencias son debidas a la presencia de diferentes especies en el cultivo y aunque reconocen la influencia que en los cambios de los patrones de los rodlets entre una misma especie puedan ser atribuidos a condiciones medio ambientales, sustentan que una misma especie puede presentar diferencias por heterocariosis, ciclo parasexual o ambos por lo cual sugiere que en el caso de usar la técnica para la clasificación de una espécimen se parta de cultivos monospóricos (Hess et al., 1968). El inóculo usado en este estudio fue obtenido de un cultivo monospórico, por lo cual se cree que estas las diferencias en los patrones de agregación en las paredes de los conidios de *Penicillium* sp. HC1 corresponden a una respuesta del hongo a su entorno nutricional y que de algún modo podrían tener cierta relación con la tolerancia térmica observada.

Hoy en día se reconoce que la pared celular es una estructura dinámica que cambia y se adapta según las condiciones del medio ambiente, es posible que la regulación de la síntesis y componentes de la membrana estén relacionados con los componentes del medio y con la capacidad de tolerar condiciones de estrés. En la levadura *Candida albicans* al cambiar la fuente de carbono, cambia la arquitectura de la pared y el espesor de los componentes: quitina, glucano y el manano, además se observó para este patógeno que, estos cambios se asocian con respuestas diferenciales al estrés osmótico (Ene, Adya, et al. 2012) y en otro estudio con el mismo hongo se encontró que la fuente de carbono cambia el proteoma asociado a la pared celular del hongo (Ene, Heilmann, et al. 2012). Para llegar a este tipo de resultados será necesario abordar el problema desde otro tipo de técnicas experimentales, por ejemplo microscopía electrónica de transmisión con la cual se puede obtener información sobre la distribución de componentes, espesor y arreglos internos de la pared celular de *Penicillium* sp. HC1; microscopía de fuerza atómica para visualizar con más detalles los arreglos de los rodlets en la pared celular de *Penicillium* sp. HC1 o un análisis proteómico que permita determinar cambios en la expresión de proteínas de la pared en diferentes condiciones de cultivo.

En algunos estudios se ha establecido una relación entre la conidiogénesis, las hidrofobinas asociadas a la pared celular y la tolerancia a las condiciones de estrés en conidios de diversos hongos filamentosos incluyendo a *Penicillium*. En 2008, Boulem y colaboradores, correlacionaron

la expresión de tres genes en *Penicillium camemberti*, en un medio sintético con glucosa y amonio, crecido en cultivo en estado sólido y líquido y encontraron que en estado líquido el hongo no produjo estructuras de conidiación e indicaron que la ausencia de conidiación en cultivo líquido se correlacionó con la falta de expresión del gen *rodA*, un gen que codifica una hidrofobina y que ésta podría ser regulada por la composición del medio de cultivo independientemente de la expresión de los genes *brlA* y *wetA*, implicados en la conidiogénesis (Boualem et al. 2008).

En 2016, Boulem y colaboradores, asociaron la hidrofobicidad de conidios de *Penicillium camemberti* con la fase del cultivo donde eran producidos y encontraron que los conidios producidos en medio líquido eran 25% menos hidrofóbicos que los conidios producidos en cultivo sólido, y esto se correlacionó con una expresión siete veces menor del gen *rodA* que codifica la hidrofobina RodA en el micelio cultivado en cultivo líquido.(Boualem et al. 2016). En el entomopatógeno *B. bassiana* la expresión del gen *wetA* se asoció, no solo con la maduración de los conidios, sino indispensables para la conidiación; los conidios en los que se delecionó *wetA* mostraron características más defectuosas incluyendo menor tamaño, menor densidad, menor hidrofobicidad y alteración de las paredes celulares, como resultado, estos conidios fueron más sensibles a la menadiona oxidante y al estrés por calor húmedo a 45°C (Li et al. 2015). De igual manera, los mutantes de *wetA* en *Penicillium digitatum* mostraron varios fenotipos defectuosos, tales como conidios anormales con paredes celulares laxas, germinación retardada y tolerancia reducida a tensiones osmóticas, tratamiento con detergente, choque térmico y a tratamientos con menadiona (antifúngico), pero elevada resistencia a H₂O₂ (Wang et al. 2015).

Para resumir se encontró que *Penicillium* sp. HC1 sensa la condiciones nutricionales del cultivo donde crece y esto ocurre antes de las primeras horas de cultivo. Probablemente un mecanismo asociado al proceso de conidiogénesis y metabolismo de las fuentes de carbono y nitrógeno se relacionan con las características de los conidióforos y los conidios. Aunque no fue posible establecer una relación clara entre las características de los conidios y los conidióforos, al parecer existe una tendencia a que en medio líquido los conidióforos mas sencillos están presentes en medios en los que se encuentra conidios tolerantes y que los conidios encontrados en estos medios tienden a presentar arreglos cerebroidiformes mas homogenos y con crestas de menor grosor, es posible que ésta morfología represente un mecanismo físico que confiera mayor tolerancia a los conidios. En el futuro se requerirá del diseño de experimentos en donde

se evalúen los conidióforos y conidios producidos a menor tiempo de cultivo, intentando sincronizar la etapa de conidiogénesis, también se requerirá de la evaluación de diferentes tratamientos térmicos para determinar la relación de estos con las características de la superficie de los conidios tolerantes y realizar prueba de hidrofobicidad que ayuden a dilucidar si cambios en la proteínas asociadas a pared que se generan en conidios con tolerancia puedan explicar este fenómeno.

3.2 Contenido de trehalosa y manitol de conidios de *Penicillium* sp HC1 en medios de cultivos que producen conidios de alta y baja tolerancia térmica

Otro mecanismo implicado en la tolerancia térmica observada en conidios de entomopatógenos ha sido la acumulación de polioles y trehalosa. En este estudio se evaluó la acumulación de trehalosa y manitol por HPLC como posibles características de composición químicas de los conidios que se asocia a su termotolerancia.

En la Figura 4-12 se muestran los resultados obtenidos de la viabilidad, tolerancia térmica, y cuantificación de trehalosa y manitol en conidios de *Penicillium* sp. HC1 en medios líquidos que contienen sacarosa como fuente de carbono. Para estos medios los conidios con bajos porcentajes viabilidad, se asocian a conidios con altos porcentajes de tolerancia térmica, por el contrario, conidios con altos porcentajes de viabilidad se asocian a conidios con bajos porcentajes tolerancia térmica. Cuando se compara el contenido de manitol con estas características de calidad de los conidios, se observa que los conidios que presentan mayor tolerancia térmica acumulan cerca de 100 mg/g de manitol, mientras que conidios de menor tolerancia acumulan en promedio 60 mg/g. Los conidios obtenidos en PDA que presentan tolerancia intermedia y alta viabilidad acumulan menos de 60 mg/g de manitol. Para el caso de la trehalosa, se encontró que solo los conidios producidos en el medio S10-E10 acumularon trehalosa en una concentración de 20 mg/g. Los conidios obtenidos en PDA acumularon en promedio 60mg/g de trehalosa; para el resto de medios con sacarosa evaluados, se estima que la concentración puede estar por debajo del límite de detección que corresponden a 20 mg/g de trehalosa o no se acumula.

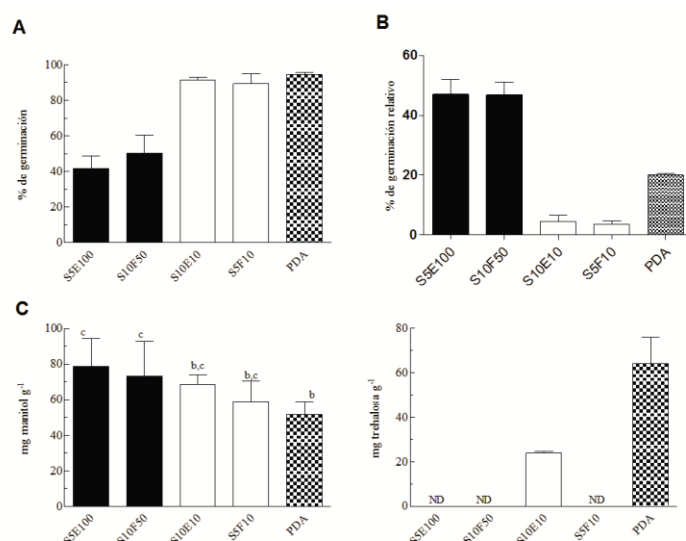


Figura 4-12: Viabilidad, tolerancia térmica y contenido de Trehalosa y Manitol en conidios de *Penicillium* sp HC1 en medios líquidos que contienen sacarosa como fuente de carbono²⁵.

En la Figura 4-13 se muestran los resultados obtenidos de viabilidad, tolerancia térmica, y cuantificación de trehalosa y manitol en conidios de *Penicillium* sp. HC1 en medios líquidos que contienen harina de almidón como fuente de carbono. En estos medios, la viabilidad de los conidios se asocia a la fuente de nitrógeno, conidios con fuente de nitrógeno inorgánica presentan mayor porcentaje de viabilidad, mientras que conidios con fuente de nitrógeno orgánica y compleja como el extracto de levadura presentan menor porcentaje de viabilidad. La tolerancia térmica no se asocia al porcentaje de viabilidad. La cantidad de manitol acumulada en los medios con harina de almidón osciló entre los 10 y 30 mg/g y no se observaron diferencias significativas entre ellos, excepto para el medio A10-E50 en el que no fue detectado manitol.

²⁵ *Penicillium* sp HC1 fue cultivado a 25°C, 150 rpm durante 8 días en medio líquido; los conidios fueron separados del micelio, concentrados en A: La viabilidad en porcentaje de germinación es mostrada; en B: La tolerancia térmica a un tratamiento de 50°C por 1 hora se representa como porcentaje de germinación relativa. Los conidios concentrados fueron secados y ebullidos durante 3 horas para la extracción de manitol y trehalosa. La cuantificación del contenido de trehalosa y manitol fue realizada por HPLC. C: Contenido de manitol por gramo de conidio seco y D: Contenido de trehalosa por gramo de conidio seco. Las barras de color negro representan a los medios de alta tolerancia térmica, las barras de color blanco a los medios de baja tolerancia térmica, las barras grises a PDA. Las líneas delgadas en la mitad de las barras representa la desviación estándar de tres experimento y las letras corresponden a los subconjuntos para $p=0.05$ de una prueba HSD de Tukey. Alta tolerancia térmica corresponde a porcentajes de germinación relativa mayores al 20% cuando los conidios son sometidos a un tratamiento térmico de 50°C durante 1 hora. ND: No detectada o menor a 20mg/g de conidios secos

Para el caso de la trehalosa en ninguno de los medios con harina de almidón fue detectada (Figura 4-12 panel A y B).

La acumulación de trehalosa y manitol en los conidios de diversos hongos filamentosos es un aspecto multifactorial y las condiciones de mayor acumulación dependen de la especie, la edad del cultivo, el pH, la temperatura de cultivo, la fuente de carbono, la cantidad de carbono y la actividad acuosa (a_w) del cultivo (Hallsworth & Magan 1996).

El primer estudio sobre el contenido de trehalosa y manitol en conidios no germinados de *Penicillium* sp fue realizado por Ballio y colaboradores en 1964 y se encontró que para la especie de *P. chrysogenum* cultivada en agar sacarosa, la cantidad de manitol acumulada fue de aproximadamente 47 mg/g y la cantidad de trehalosa acumulada fue de aproximadamente 42 mg/g. En este estudio se encontró que los conidios de *Penicillium* sp. HC1 obtenidos en PDA acumulan más trehalosa (en promedio 60 mg/g) que manitol (en promedio 50 mg/g) y las cantidades cuantificadas oscilan en los mismos ordenes de magnitud que los reportado por Ballio et al para *P. chrysogenum*.

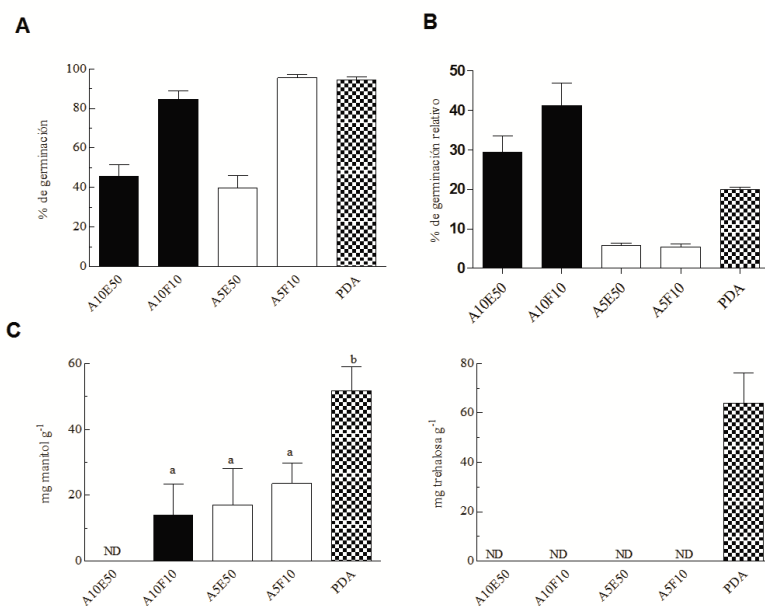


Figura 4 -13: Viabilidad, tolerancia térmica y contenido de Thehalosa y Manitol en conidios de *Penicillium* sp HC1 que contienen harina de almidón como fuente de carbono²⁶.

Se desconoce de investigaciones en donde se evalúe el contenido de manitol y trehalosa en conidios de *Penicillium* sp obtenidos en cultivo sumergido y la relación entre el contenido de trehalosa y manitol con la tolerancia a condiciones de estrés de este hongo. Sin embargo, otras investigaciones realizadas con hongos filamentosos entomopatógenos muestran que por ejemplo para la especie *Metarhizium anisopliae* la cantidad de manitol que se acumula cuando el hongo es crecido en agar Sabouraud Dextrosa (SDA) a 25°C y a un pH entre 5 y 10 es de cerca de 100mg/g, mientras que la cantidad de trehalosa en estas mismas condiciones están por debajo de los 10 mg/g (Hallsworth & Magan 1996). Otro estudio con la misma especie de hongo, *Metarhizium anisopliae*, realizado en condiciones de cultivo sumergido en el medio de cultivo Jenkins modificado que entre otros ingredientes contiene: extracto de levadura, fructosa y lecitina; la cantidad de manitol acumulada fue de 0,446 mg/g, mientras que la cantidad de trehalosa fue de 0,083 mg/g (Leland et al. 2005); cabe anotar que estas cantidades con relación a las condiciones descritas por Hallsworth y Magan corresponden hasta tres órdenes de magnitud menor o mil veces menos, lo que podría explicar el hecho de que no se haya detectado trehalosa en la mayoría de las condiciones de cultivo líquido en este estudio. Del mismo modo, Hallsworth y Magan afirman que el micelio, las blastosporas y los conidios sumergidos que se producen en medios líquidos *in vitro*, en fermentaciones sumergidas en la industria y en la hemolinfa de los insectos pueden diferir fisiológicamente de los conidios aéreos y que la respuesta de las células fúngicas a las tensiones ambientales (especialmente aquellas que, directa o no, causan estrés hídrico) está altamente conservada y que por lo tanto, cualquier diferencia fisiológica entre los conidios aéreos y los conidios sumergidos, es probable que se relacione con el estado de desecación del primero y la actividad metabólica aumentada de este

²⁶ *Penicillium* sp HC1 fue cultivado a 25°C, 150 rpm durante 8 días en medio líquido; los conidios fueron separados del micelio, concentrados en A: La viabilidad en porcentaje de germinación es mostrada; en B: La tolerancia térmica a un tratamiento de 50°C por 1 hora se representa como porcentaje de germinación relativa. Los conidios concentrados fueron secados y ebullidos durante 3 horas para la extracción de manitol y trehalosa. La cuantificación del contenido de trehalosa y manitol fue realizada por HPLC. C: Contenido de manitol por gramo de conidio seco y D: Contenido de trehalosa por gramo de conidio seco. . Las barras de color negro representan a los medios de alta tolerancia térmica, las barras de color blanco a los medios de baja tolerancia térmica, las barras grises a PDA. Las líneas delgadas en la mitad de las barras representa la desviación estándar de tres experimento y las letras corresponden a los subconjuntos para $p=0.05$ de una prueba HSD de Tukey. Alta tolerancia térmica corresponde a porcentajes de germinación relativa mayores al 20% cuando los conidios son sometidos a un tratamiento térmico de 50°C durante 1 hora. ND: No detectada o menor a 20mg/g de conidios secos

último (Hallsworth & Magan 1996).

Los altos niveles de trehalosa en ascosporas de *T. macrosporus* se degradan rápidamente a glucosa tras la activación de las esporas al igual que *Aspegillus niger* (Wyatt et al. 2013) (Fillinger et al. 2001). Los conidios de *Penicillium* sp. HC1, obtenidos en PDA contienen mayor trehalosa que manitol; en medio sólido conidios aéreos de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces farinosus* por el contrario acumulan mayor contenido de manitol y este es el poliol predominante en los conidios de las tres especies *M. anisopliae*, por ejemplo, acumuló manitol hasta 75,2 mg/g cuando se cultivaron en medios de glucosa (J. Hallsworth & Magan, 1994). En este estudio caso las condiciones en la que los conidios de *Penicillium* sp. HC1 acumularon mayor cantidad de manitol fue cuando se produjeron en medio líquido con sacarosa como fuente de carbono.

Finalmente, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) por fuente de carbono y relación C:N, que es mostrado en la Figura 4-10. En los medios de cultivo con sacarosa, el componente 1 explica el 37,63 % de variación mientras que el componente 2 explica el 23,42%. Se observó que baconidios con mayor viabilidad se encuentran muy cercanos a medios en los que se encontraban los conidióforos más largos. Mientras que para los medios con sacarosa en los que la tolerancia térmica de los conidios fue la más alta, se encontraban cercanos a medios en los que con el contenido de manitol de los conidios fue el más alto y estos medios presentaban la mayor limitación por nitrógeno (relaciones C:N 100:1 y 50:1). Cuando se evaluó la harina de almidón como fuente de carbono, el componente 1 explica el 30,35 % de la variación, mientras que el componente 2 explica el 20,59%. Los grupos fueron separados por medio de cultivo y relación C:N. La característica de calidad viabilidad de los conidios se encuentra cercana al factor fuente de nitrógeno, mientras que la termotolerancia se encuentra cercana al factor concentración inicial de almidón. Estos resultados sugieren, que el manitol se encuentra relacionado con la tolerancia térmica de conidios producidos en medios con sacarosa, pero en el caso de los conidios producidos en medios con harina de almidón, aun no quedan claros que mecanismos se encuentran asociados a la tolerancia térmica.

Los resultados de esta investigación muestran que *Penicillium* sp. HC1, es un hongo sensible a los factores nutricionales a los que es expuesto y las interacciones de estos factores. Aunque aún se sigue desconociendo de qué modo son sentidos por el hongo, estos factores nutricionales, desencadenan una respuesta celular que afectan varias etapas en el ciclo del hongo, entre ellas, la germinación, morfología del crecimiento, tipo de conidióforo durante la

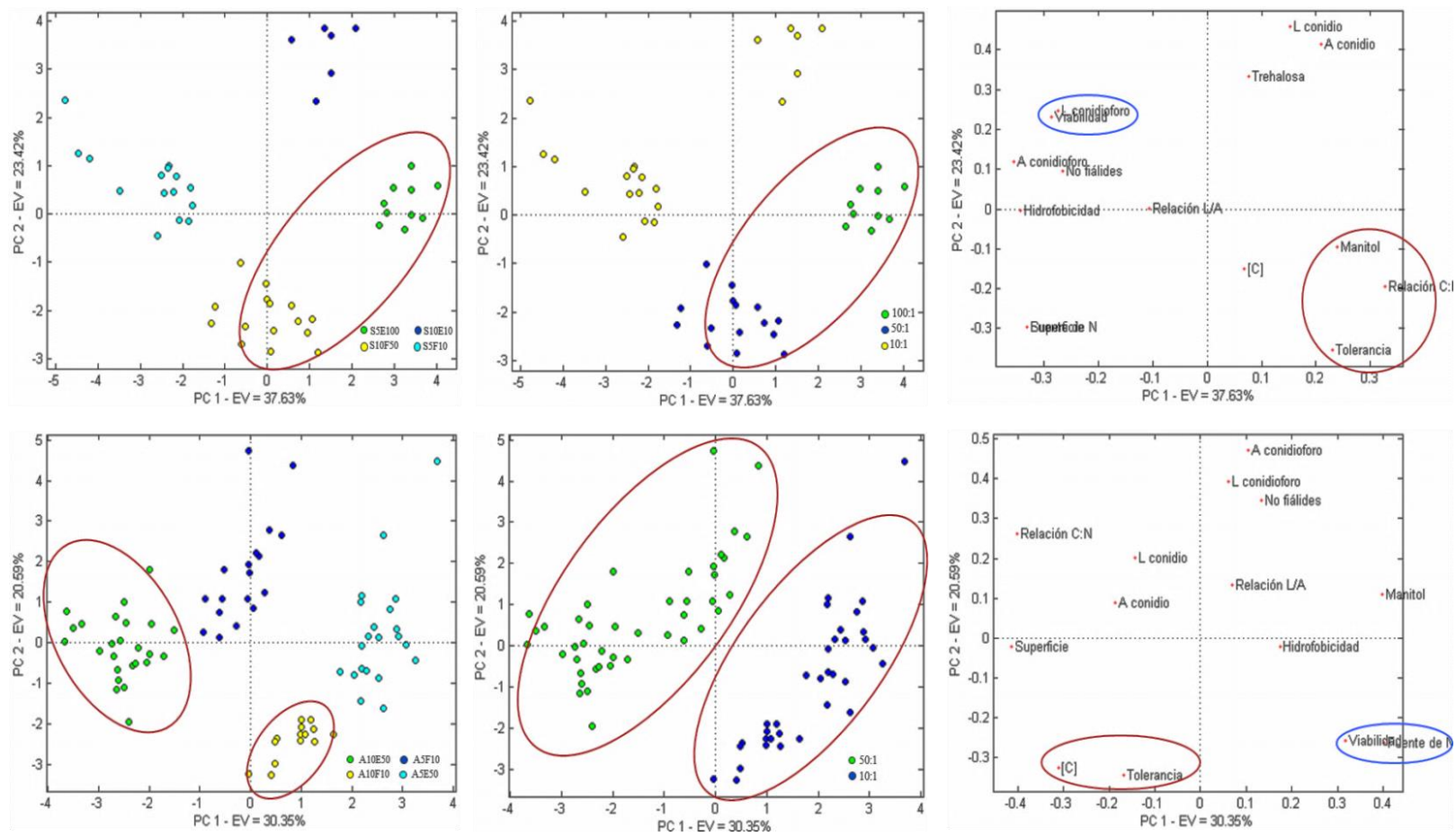
conidiogénesis y también las características de los conidios, tamaño, acumulación de trehalosa y manitol, arreglos superficiales de la pared celular, viabilidad y tolerancia térmica y es posible que estos cambios se deban a mecanismo de respuesta diferentes que siguen sin dilucidar y deberán ser abordados como nuevas preguntas de investigación en el futuro.

A partir de los resultados obtenidos surgen nuevas preguntas asociadas al modelo biológico *Penicillium* sp HC1 entre ellas ¿cómo los factores nutricionales influyen en la acumulación de polioles?, ¿por qué no fue posible detectar trehalosa en la mayoría de los conidios generados en medios de cultivo en estado líquido?, ¿los arreglos de la pared celular externa están implicados en la tolerancia térmica de los conidios?, ¿por qué no hay relación directa entre la viabilidad y la tolerancia térmica?, ¿la viabilidad y la tolerancia térmica están asociadas a mecanismos diferentes? ¿De qué modo el tipo de conidióforo determina las características de los conidios, hay relación entre estas variables?

Desde el punto de vista de producción deberán considerarse que atributos de calidad serán más valiosos para los conidios de *Penicillium* sp HC1, ya que dependiendo de la fuente de carbono, concentración inicial de carbono, relación C:N usada, se encontró que no necesariamente los atributos de calidad: viabilidad y tolerancia térmica mantienen una relación directa. En los casos de conidios seleccionados por su alta tolerancia térmica que provenían de fuentes de carbono como la sacarosa, independientemente de la fuente de nitrógeno se observó una asociación inversa entre estos atributos, mientras que para los conidios seleccionados por su alta tolerancia provenientes de fuentes de carbono complejas como la harina de almidón se observó, que la tolerancia y la viabilidad se asocian de modo directamente proporcional, en este estudio se encontró que los más altos porcentajes de viabilidad se asociaron con altos porcentajes de tolerancia térmica en el medio en el que se combinó: almidón 10g/L y fosfato diamónico en relación C:N 10:1.

Conclusión, se encontró que la fuente de carbono, la concentración inicial de la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno y relación C:N, afectan la producción de biomasa y la producción de conidios de *Penicillium* sp. HC1 en medio líquido. Esto sugiere que la estrategia para la producción de conidios deberá diseñarse en consideración de estos factores y sus combinaciones para la producción de un número de conidios viables y tolerantes a estrés térmico. El medio S10-F50 fue una de las mejores combinaciones en las que usando sacarosa fuente de carbono se produjeron conidios viables y tolerantes; y usando harina de almidón como fuente de carbono el medio A10-F10 resultó la combinación en la que se presentaron

resultados equivalentes.



Figura

4-14: Análisis de componentes principales

5 Conclusiones y recomendaciones

Conclusiones

La producción de biomasa, producción de conidios, viabilidad y tolerancia térmica de conidios de *Penicillium* sp. HC1 en medio de cultivo líquido, dependen de los factores fuente de carbono, concentración de carbono, fuente de nitrógeno, relación C:N y sus interacciones.

Dependiendo de la fuente de carbono y nitrógeno, la concentración inicial de la fuente de carbono y la relación C:N, son los factores que más afectan la tolerancia a estrés térmico de los conidios de *Penicillium* sp. HC1 en medio de cultivo líquido. Cuando se trata de sacarosa-fosfato diamónico la limitación por nitrógeno aumenta la tolerancia térmica de los conidios, mientras que si la fuente de nitrógeno es extracto de levadura, la tolerancia de los conidios se incrementa con la limitación por carbono y nitrógeno. Cuando las fuentes son harina de almidón fosfato diamónico, la tolerancia a estrés térmico de los conidios disminuye con la limitación por carbono y nitrógeno y con extracto de levadura la tolerancia térmica no es superior al 50%.

Los conidios de *Penicillium* sp. HC1 inoculados en los medios de cultivos líquidos con S5E100, S10E10, S10F50, A10E50, A5E50, A10F10 y A5F10, germinan en un 80% antes de las 48 horas de cultivo. En medios con fuente de carbono compleja y de nitrógeno orgánico ocurren procesos de conidiogénesis microcíclica a la hora 30 de cultivo; los conidios geminados producen estructuras de conidiación diferentes al día 8 de cultivo y dependen de la combinación de la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno.

Los conidios de *Penicillium* sp. HC1 obtenidos en medios líquidos S5E100, S10E10, S10F50, A10E50, A5E50, A10F10 y A5F10 son redondeados y de tamaño variable; la superficie de los conidios presenta ornamentos protuberantes e irregulares con patrones

cerebriformes. Estos ornamentos son diferentes para los conidios producidos en cada medio. No se pudo establecer una relación entre la superficie del conidio y su tolerancia térmica.

Los conidios producidos en medio líquido contienen menos cantidad de trehalosa que los producidos conidios producidos en agar papa dextrosa y las mayores concentraciones de manitol fueron detectadas en medios con sacarosa como fuente de carbono. Aunque el contenido de manitol fue mayor en los conidios producidos en los medios que presentaron conidios con mayor tolerancia térmica en comparación a los que no, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Recomendaciones

Se desconoce el papel del nitrógeno en el proceso de conidiogénesis de *Penicillium spp.* y *Penicillium sp.* HC1, aunque los resultados sugieren que este nutriente es usado para la síntesis de biomasa, parece que la fuente de nitrógeno por sí sola no es un factor esencial para la producción de conidios pero la C:N si, se desconoce el consumo del mismo al finalizar el tiempo de cultivo por lo cual se sugiere cuantificar la cantidad de nitrógeno en las diferentes etapas del ciclo de hongo durante el cultivo.

Según las publicaciones consultadas, la trehalosa se acumula cuando el hongo es sometido a condiciones de estrés y principalmente estrés térmico y oxidativo pero en otros hongos filamentosos como *A. niger* se degrada rápidamente una vez inicia la germinación. No se logró detectar trehalosa en la mayoría de las condiciones de cultivo líquido, probablemente porque estas se encuentren por debajo del límite de detección logrado con la metodología empleada, o debido a que las condiciones de cultivo en medio líquido puedan activar rápidamente la germinación de los conidios recién generados o porque otros mecanismos de protección estén asociados. En trabajos futuros sería interesante aclarar esta pregunta ya que se observó que a las 30 horas de cultivo nuevos ciclos de re-germinación están ocurriendo en algunos medios, lo que indica que al día 8 la población de conidios es heterogénea y aunque la prueba de tolerancia se realizó a los mismos

conidios cosechados los tiempos de procesamiento de las muestra para concentrar la cantidad de conidios requeridas para la determinación de trehalosa y manitol llegaron a superar las 24 horas. Por lo anterior se sugiere, usar mayor concentración de conidios para mejorar el umbral de detección, determinar la cantidad de glucosa o determinar la cantidad actividad trehalasa a los conidios a los que se les realiza cuantificación de trehalosa y manitol.

Para trabajo futuro se recomienda

- Continuar indagando sobre **los mecanismos asociados a la tolerancia térmica**.
- **Evaluar morfología de conidios sometidos a diferentes tratamiento térmicos** con el fin de establecer de modo más preciso la relación entre la termotolerancia y las características de la pared celular.
- Estudiar la **hidrofobicidad de los conidios producidos** en medio líquido y sólido y presencia de hidrofobinas.
- **Cuantificar el contenido de glucosa en los conidios** como un posible indicio de activación de los conidios que pueda explicar la ausencia de trehalosa en la mayoría de los conidios en medio líquido y/o descartar este disacárido como posible termo-protectante.
-
- Evaluar la **acumulación de otros polioles como arabitol, eritrilo o glicerol** como otros posibles solutos termo-protectantes.
- Evaluar la presencia de **proteínas del choque térmico** en conidios termotolerantes.
- Evaluar la aparición de la **conidiogénesis microciclica** en medios que contienen harina de almidón.

A. Anexo: Composición de medios de cultivo con sacarosa

Numero	Nombre del medio	Fuente de Carbono (g.L ⁻¹)	Fuente de Nitrógeno (g.L ⁻¹)	Relación C:N
1	S10-F10	Sacarosa (10.00)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (2.315)	10:1
2	S10-F30	Sacarosa (10.00)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (0.772)	30:1
3	S10-F50	Sacarosa (10.00)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (0.463)	50:1
4	S10-F80	Sacarosa (10.00)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (0.289)	80:1
5	S10-F100	Sacarosa (10.00)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (0.231)	100:1
6	S5-F10	Sacarosa (5.00)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (1.157)	10:1
7	S5-F30	Sacarosa (5.00)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (0.386)	30:1
8	S5-F50	Sacarosa (5.00)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (0.231)	50:1
9	S5-F80	Sacarosa (5.00)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (0.145)	80:1
10	S5-E100	Sacarosa (5.00)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (0.116)	100:1
11	S10-E10	Sacarosa (10.00)	Extracto de levadura (6.781)	10:1
12	S10-E30	Sacarosa (10.00)	Extracto de levadura (2.260)	30:1
13	S10-E50	Sacarosa (10.00)	Extracto de levadura (1.356)	50:1
14	S10-E80	Sacarosa (10.00)	Extracto de levadura (0.848)	80:1
15	S10-E100	Sacarosa (10.00)	Extracto de levadura (0.678)	100:1
16	S5-E10	Sacarosa (5.00)	Extracto de levadura (6.781)	10:1
17	S5-E30	Sacarosa (5.00)	Extracto de levadura (2.260)	30:1
18	S5-E50	Sacarosa (5.00)	Extracto de levadura (1.356)	50:1
19	S5-E80	Sacarosa (5.00)	Extracto de levadura (0.848)	80:1
20	S5-E100	Sacarosa (5.00)	Extracto de levadura (0.678)	100:1

B. Anexo: Composición de medios de cultivo con harina de almidón

Numero	Nombre del medio	Fuente de Carbono (g.L ⁻¹)	Fuente de Nitrógeno (g.L ⁻¹)	Relación C:N
1	A10-F10	Harina de almidón(10.00)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (2.149)	10:1
2	A10-F30	Harina de almidón(10.00)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (0.716)	30:1
3	A10-F50	Harina de almidón(10.00)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (0.430)	50:1
4	A10-F80	Harina de almidón(10.00)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (0.269)	80:1
5	A10-F100	Harina de almidón(10.00)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (0.215)	100:1
6	A5-F10	Harina de almidón(5.00)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (1.075)	10:1
7	A5-F30	Harina de almidón(5.00)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (0.358)	30:1
8	A5-F50	Harina de almidón(5.00)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (0.215)	50:1
9	A5-F80	Harina de almidón(5.00)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (0.134)	80:1
10	A5-E100	Harina de almidón(5.00)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (0.107)	100:1
11	A10-E10	Harina de almidón(10.00)	Extracto de levadura (6.270)	10:1
12	A10-E30	Harina de almidón(10.00)	Extracto de levadura (2.090)	30:1
13	A10-E50	Harina de almidón(10.00)	Extracto de levadura (1.254)	50:1
14	A10-E80	Harina de almidón(10.00)	Extracto de levadura (0.784)	80:1
15	A10-E100	Harina de almidón(10.00)	Extracto de levadura (0.627)	100:1
16	A5-E10	Harina de almidón(5.00)	Extracto de levadura (3.135)	10:1
17	A5-E30	Harina de almidón(5.00)	Extracto de levadura (1.045)	30:1
18	A5-E50	Harina de almidón(5.00)	Extracto de levadura (0.627)	50:1
19	A5-E80	Harina de almidón(5.00)	Extracto de levadura (0.392)	80:1
20	A5-E100	Harina de almidón(5.00)	Extracto de levadura (0.314)	100:1

Anexo: Composición de solución

C. Solución de micronutrientes

Micronutriente	Concentración (g/L)
FeSO ₄	2
CaCl ₂	2
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.2
CuCl ₂ 2H ₂ O	0.01
NiCl ₃ 6H ₂ O	0.2
MnCl ₂ 4H ₂ O	0.03
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.1
H ₃ BO ₃	0.3
NaMoO ₄ 2H ₂ O	0.03
En solución 0.1 N de HCl	

D. Anexo: Datos diseño factorial

	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Response 1	Response 2	Response 5	Response 6
Run	A:Fuente de C	B:Fuente de nitrógeno	C:Relacion C:N	D:C inicial de C	Biomasa día 8	Log 10 Numero de conidios día 8	Germinación	Tolerancia relativa a 50°C
				g/L	g/L	con /mL	%	%
1	Almidón	Fosfato de amonio	10:1	10	7,00	7,0000	93	77
2	Sacarosa	Fosfato de amonio	30:1	5	1,40	5,8451	19	0
3	Sacarosa	Fosfato de amonio	50:1	5	2,20	5,4771	83	0
4	Sacarosa	Extracto de lev	30:1	10	4,80	5,9542	89	0
5	Almidón	Fosfato de amonio	10:1	10	7,20	6,3010	94	76
6	Sacarosa	Extracto de lev	10:1	10	7,40	5,3010	62	1
7	Almidón	Extracto de lev	100:1	10	2,42	6,6800	40	1
8	Almidón	Extracto de lev	10:1	5	2,80	5,9031	46	3
9	Almidón	Fosfato de amonio	100:1	5	2,20	5,6990	12	4
10	Sacarosa	Fosfato de amonio	50:1	10	5,40	7,7993	86	72
11	Almidón	Extracto de lev	100:1	5	1,80	6,4914	70	0
12	Almidón	Extracto de lev	100:1	10	6,62	6,2600	27	0
13	Sacarosa	Fosfato de amonio	50:1	5	2,00	5,9031	88	2
14	Almidón	Fosfato de amonio	50:1	5	1,60	5,3010	21	2
15	Sacarosa	Fosfato de amonio	80:1	5	2,40	5,4771	46	2
16	Almidón	Extracto de lev	10:1	5	2,60	6,2553	64	0
17	Almidón	Extracto de lev	80:1	5	1,80	6,4771	64	8
18	Almidón	Fosfato de amonio	30:1	10	7,20	6,4771	92	60
19	Almidón	Extracto de lev	10:1	5	2,40	6,6435	80	2
20	Almidón	Fosfato de amonio	80:1	10	3,60	6,0000	86	3
21	Almidón	Extracto de lev	30:1	10	3,66	6,2000	81	7
22	Sacarosa	Fosfato de amonio	80:1	10	4,80	7,3979	79	55
23	Almidón	Extracto de lev	100:1	10	4,08	6,0400	38	2
24	Almidón	Fosfato de amonio	80:1	10	2,20	6,0000	56	2
25	Almidón	Fosfato de amonio	100:1	10	3,00	5,3010	60	4
26	Sacarosa	Fosfato de amonio	100:1	10	2,00	5,0000	43	0

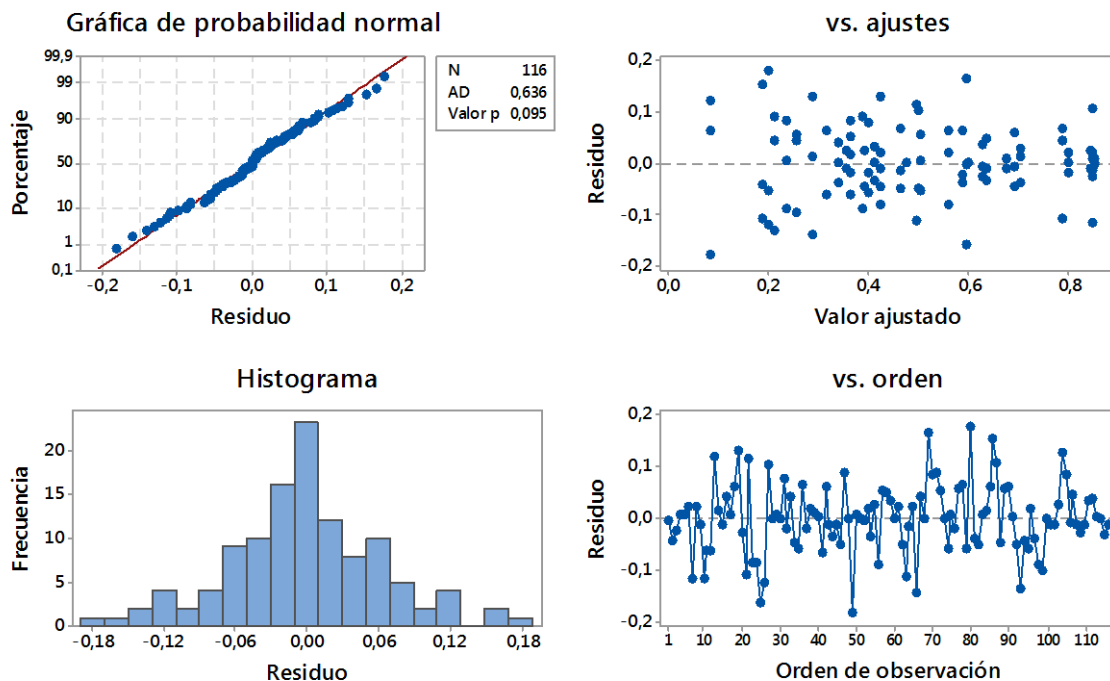
	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Response 1	Response 2	Response 5	Response 6
Run	A:Fuente de C	B:Fuente de nitrógeno	C:Relacion C:N	D:C inicial de C	Biomasa día 8	Log 10 Numero de conidios día 8	Germinación	Tolerancia relativa a 50°C
				g/L	g/L	con /mL	%	%
27	Almidón	Extracto de lev	80:1	10	2,72	5,7000	86	2
28	Almidón	Fosfato de amonio	80:1	5	1,20	5,3010	41	10
29	Sacarosa	Extracto de lev	30:1	5	4,00	5,4771	96	0
30	Sacarosa	Fosfato de amonio	100:1	10	4,00	5,0000	85	0
31	Sacarosa	Fosfato de amonio	50:1	10	7,20	7,8325	88	61
32	Sacarosa	Fosfato de amonio	100:1	5	2,20	5,0000	38	6
33	Sacarosa	Extracto de lev	80:1	5	3,00	5,4771	89	10
34	Sacarosa	Fosfato de amonio	30:1	10	6,00	6,3979	63	15
35	Almidón	Extracto de lev	10:1	10	2,00	6,5200	33	20
36	Sacarosa	Extracto de lev	80:1	10	4,40	5,6990	47	5
37	Sacarosa	Extracto de lev	80:1	5	2,20	5,0000	87	10
38	Sacarosa	Fosfato de amonio	80:1	10	7,20	7,2553	71	2
39	Almidón	Fosfato de amonio	50:1	10	2,80	6,6021	88	20
40	Sacarosa	Fosfato de amonio	10:1	10	7,40	6,5798	34	7
41	Sacarosa	Extracto de lev	100:1	10	5,20	5,9031	40	19
42	Sacarosa	Fosfato de amonio	10:1	5	3,20	5,8451	88	0
43	Sacarosa	Fosfato de amonio	80:1	5	2,00	5,9031	34	0
44	Almidón	Extracto de lev	30:1	10	4,48	6,2600	72	11
45	Almidón	Extracto de lev	10:1	5	2,60	6,2041	73	5
46	Almidón	Extracto de lev	100:1	5	1,00	6,3617	60	0
47	Sacarosa	Extracto de lev	10:1	5	4,00	5,9542	65	2
48	Sacarosa	Extracto de lev	10:1	10	6,80	5,6021	78	1
49	Sacarosa	Extracto de lev	30:1	5	2,80	5,9542	98	0
50	Sacarosa	Extracto de lev	50:1	5	3,00	5,6990	88	4
51	Sacarosa	Extracto de lev	50:1	5	1,20	6,0414	89	1
52	Sacarosa	Fosfato de amonio	30:1	10	6,30	6,6532	82	11
53	Almidón	Fosfato de amonio	50:1	5	0,80	5,4771	46	1
54	Sacarosa	Extracto de lev	30:1	10	4,80	5,7782	83	1
55	Almidón	Fosfato de amonio	10:1	10	7,08	6,7782	95	76
56	Almidón	Extracto de lev	80:1	10	3,90	6,6000	52	0
57	Sacarosa	Fosfato de amonio	30:1	10	6,60	6,4914	66	18
58	Almidón	Fosfato de amonio	10:1	5	2,40	5,0000	75	0
59	Almidón	Fosfato de amonio	100:1	5	2,40	5,6990	36	3
60	Almidón	Extracto de lev	50:1	10	1,40	6,5100	40	23

	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Response 1	Response 2	Response 5	Response 6
Run	A:Fuente de C	B:Fuente de nitrógeno	C:Relacion C:N	D:C inicial de C	Biomasa día 8	Log 10 Numero de conidios día 8	Germinación	tolerancia relativa a 50°C
				g/L	g/L	con /mL	%	%
61	Sacarosa	Extracto de lev	100:1	5	3,60	5,0000	19	45
62	Sacarosa	Fosfato de amonio	80:1	5	2,60	5,9031	47	7
63	Almidón	Fosfato de amonio	10:1	5	2,80	5,6990	77	1
64	Almidón	Extracto de lev	30:1	5	3,00	6,3222	56	1
65	Almidón	Fosfato de amonio	30:1	5	2,60	5,0000	17	2
66	Sacarosa	Extracto de lev	30:1	5	2,80	5,4771	90	1
67	Sacarosa	Fosfato de amonio	30:1	5	1,20	6,0792	17	0
68	Almidón	Fosfato de amonio	30:1	10	6,82	6,6990	80	35
69	Almidón	Fosfato de amonio	30:1	5	2,60	5,3010	66	0
70	Almidón	Extracto de lev	50:1	5	1,40	6,1139	75	1
71	Sacarosa	Fosfato de amonio	80:1	10	6,80	7,9031	75	29
72	Almidón	Extracto de lev	30:1	5	3,00	6,3222	75	1
73	Almidón	Extracto de lev	80:1	10	5,76	5,6000	69	1
74	Sacarosa	Fosfato de amonio	50:1	5	2,80	5,6021	72	0
75	Almidón	Extracto de lev	80:1	5	2,00	6,1461	53	7
76	Sacarosa	Fosfato de amonio	10:1	5	3,60	5,6021	63	0
77	Almidón	Fosfato de amonio	10:1	5	2,60	5,4771	81	1
78	Sacarosa	Fosfato de amonio	10:1	5	2,80	5,6990	64	0
79	Sacarosa	Fosfato de amonio	10:1	10	7,20	7,0043	70	5
80	Sacarosa	Extracto de lev	80:1	5	2,40	5,0000	85	8
81	Sacarosa	Extracto de lev	80:1	10	5,60	5,9031	52	3
82	Almidón	Fosfato de amonio	50:1	10	3,40	6,6021	87	18
83	Sacarosa	Extracto de lev	100:1	5	2,80	5,8451	16	64
84	Almidón	Fosfato de amonio	80:1	5	2,40	5,7782	21	7
85	Almidón	Extracto de lev	30:1	10	3,56	6,1100	77	9
86	Almidón	Fosfato de amonio	50:1	10	2,60	7,0414	91	9
87	Almidón	Fosfato de amonio	30:1	10	7,18	6,3010	73	50
88	Almidón	Extracto de lev	50:1	5	2,00	6,2304	52	7
89	Almidón	Fosfato de amonio	50:1	5	1,40	5,6021	12	4
90	Sacarosa	Fosfato de amonio	30:1	5	2,20	5,6990	10	0
91	Sacarosa	Fosfato de amonio	50:1	10	9,00	7,8976	81	42
92	Almidón	Fosfato de amonio	80:1	10	2,40	6,0000	71	2
93	Almidón	Extracto de lev	10:1	10	2,06	6,5100	39	27
94	Almidón	Fosfato de amonio	100:1	10	4,20	5,3010	44	0
95	Sacarosa	Extracto de lev	100:1	5	3,20	5,0000	18	55

Run	Factor 1 A:Fuente de C	Factor 2 B:Fuente de nitrógeno	Factor 3 C:Relacion C:N	Factor 4 D:C inicial de C	Response 1 Biomasa día 8	Response 2 Log 10 Numero de conidios día 8	Response 5 Germinación	Response 6 tolerancia relativa a 50°C
				g/L	g/L	con /mL	%	%
96	Almidón	Fosfato de amonio	30:1	5	2,20	5,3010	22	1
97	Almidón	Extracto de lev	80:1	5	1,20	6,9031	62	6
98	Sacarosa	Extracto de lev	100:1	10	4,60	5,6990	44	12
99	Almidón	Fosfato de amonio	80:1	5	1,40	5,0000	44	4
100	Almidón	Fosfato de amonio	100:1	10	3,80	5,6532	51	0
101	Sacarosa	Fosfato de amonio	100:1	5	2,00	5,7782	38	0
102	Sacarosa	Extracto de lev	50:1	5	2,00	6,1461	95	1
103	Almidón	Extracto de lev	10:1	10	1,44	6,3000	36	14
104	Sacarosa	Fosfato de amonio	100:1	10	4,00	5,0000	49	1
105	Sacarosa	Extracto de lev	30:1	10	4,60	6,2304	88	6
106	Sacarosa	Extracto de lev	80:1	10	4,80	5,6990	74	13
107	Sacarosa	Extracto de lev	100:1	10	5,40	6,0000	43	16
108	Almidón	Extracto de lev	50:1	5	2,60	6,0792	45	4
109	Almidón	Extracto de lev	50:1	10	2,08	6,0000	73	36
110	Sacarosa	Extracto de lev	50:1	10	4,20	6,2041	80	3
111	Sacarosa	Extracto de lev	10:1	5	4,80	5,9031	34	4
112	Sacarosa	Extracto de lev	10:1	5	4,20	5,8451	75	3
113	Sacarosa	Extracto de lev	50:1	10	4,00	6,5441	84	2
114	Almidón	Fosfato de amonio	100:1	5	2,20	5,8451	29	4
115	Sacarosa	Extracto de lev	50:1	10	4,60	6,1461	88	2
116	Sacarosa	Fosfato de amonio	100:1	5	2,40	6,1461	43	0
117	Almidón	Extracto de lev	50:1	10	1,74	5,7000	87	50
118	Almidón	Extracto de lev	30:1	5	3,00	6,4150	62	0
119	Sacarosa	Fosfato de amonio	10:1	10	6,60	6,7853	52	6
120	Sacarosa	Extracto de lev	10:1	10	6,80	5,9031	71	0

E. Anexo: Gráficos de diagnóstico y evaluación de supuestos del modelo estadístico variable: Biomasa

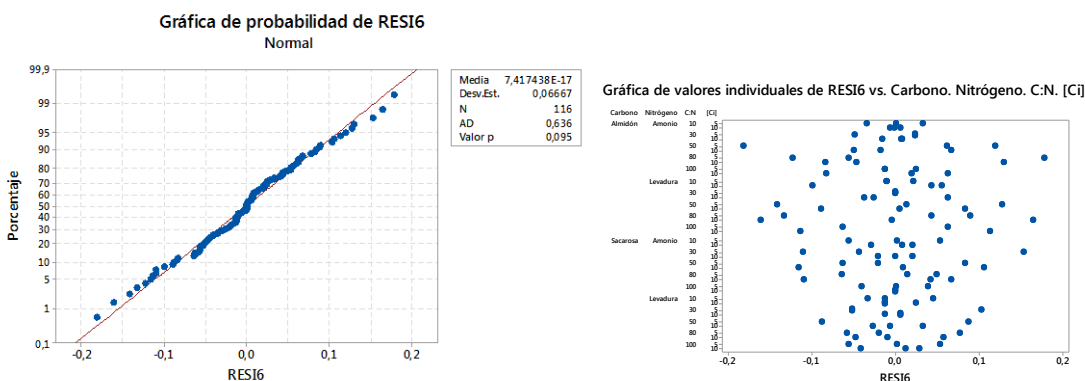
Gráficas de residuos para Log (10) Biomasa



Las gráficas de diagnóstico y el modelo de regresión factorial fueron calculados con la variable Biomasa día 8 transformada en el Log en base 10 de la variable. De los 120 datos, se evaluaron 116 datos y se eliminaron 4 que correspondían a la combinación de medios (número de corrida): S10F100 (27), S5E50 (49), A10E100 (12) Y A5E100 (41).

Prueba de normalidad de residuos

Método	Estadística de prueba	Valor p
Anderson Darling	0,636	0,095



Información de ayuda Minitab: Estadístico de Anderson-Darling

Las hipótesis para la prueba de Anderson-Darling son:

H0: Los datos siguen una distribución especificada

H1: Los datos no siguen una distribución especificada

Si el valor p (cuando está disponible) para la prueba de Anderson-Darling es inferior al nivel de significancia seleccionado (generalmente 0.05 ó 0.10), concluya que los datos no concluya que los datos no siguen la distribución especificada.

La hipótesis nula para una prueba de normalidad establece que la población es normal. La hipótesis alternativa establece que la población es no normal.

H0: los datos siguen una distribución normal vs. H1: los datos no siguen una distribución normal.

Esta prueba compara la función de distribución acumulada empírica de los datos de su muestra con la distribución esperada si los datos son normales. Si esta diferencia observada es suficientemente grande, la prueba rechazará la hipótesis nula de normalidad en la población.

Interpretación de los estadísticos de prueba

En este caso el valor p de la prueba es lo suficientemente grande (>0.05) para no rechazar la hipótesis nula de distribución normal a un nivel de significancia del 95% para un valor $\alpha = 0.05$

Prueba de varianzas iguales (Homocedasticidad) para residuos

Método	Estadística de prueba	Valor p
Levene	0,89	0,656

Interpretación de los resultados

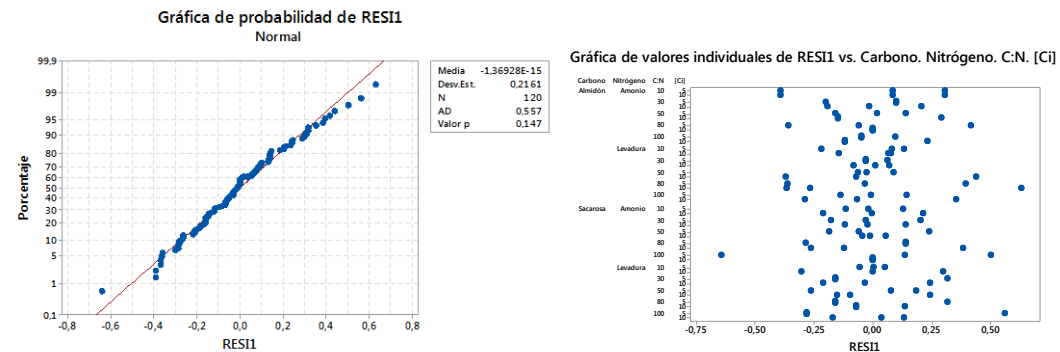
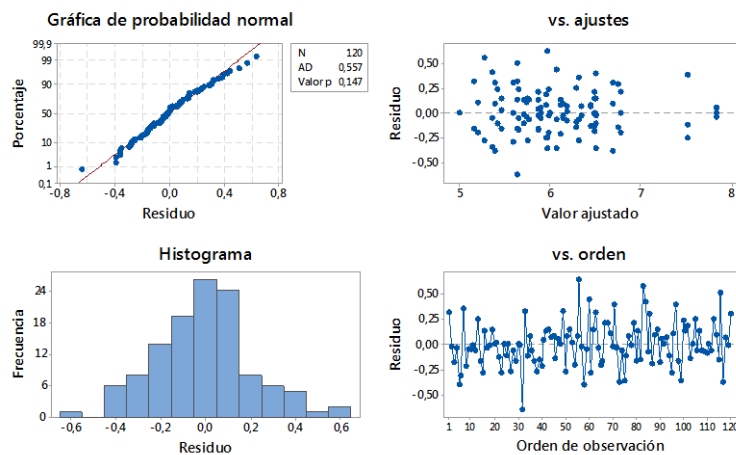
Hipótesis nula: Todas las varianzas son iguales

Hipótesis alterna: Por lo menos una varianza es diferente

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

F. Anexo: Gráficos de diagnóstico número de conidios

Gráficas de residuos para Log 10 Número de conidios día 8



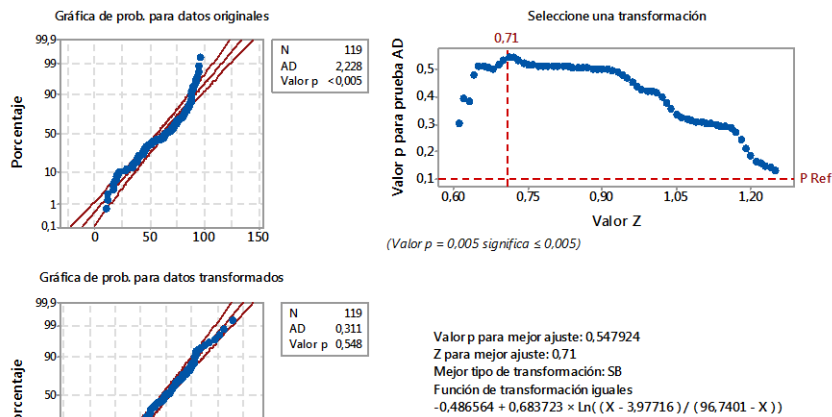
Prueba de varianzas iguales: RES11 vs. Carbono. Nitrógeno. C:N. [Ci]
Método

Hipótesis nula Todas las varianzas son iguales
Hipótesis alterna Por lo menos una varianza es diferente
Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

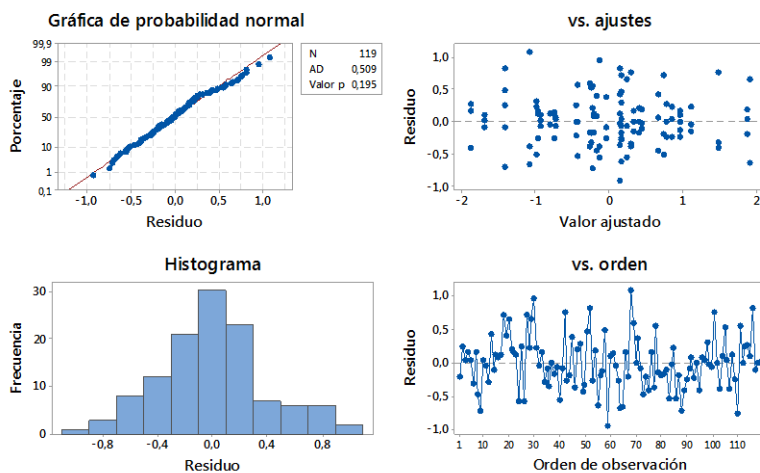
Método Estadística de prueba Valor p
Levene 0,58 0,969

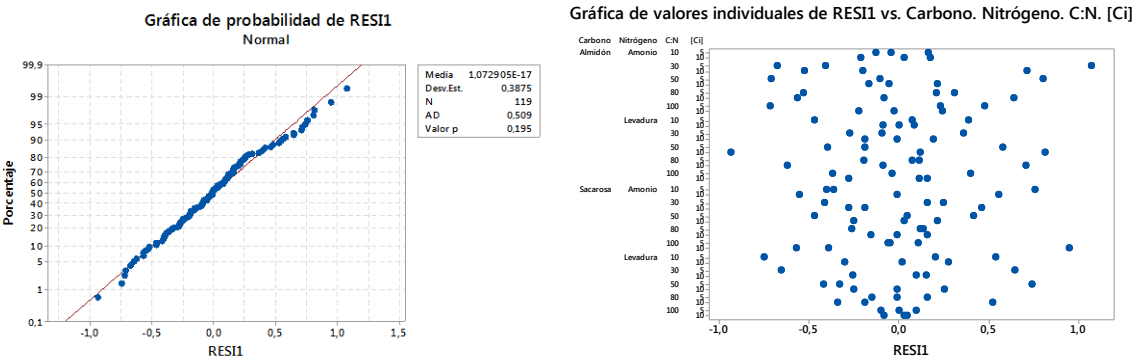
G. Anexo: Gráficos de diagnóstico Germinación

Transformación de Johnson para % Germinación



Gráficas de residuos para % Germinación Transformada





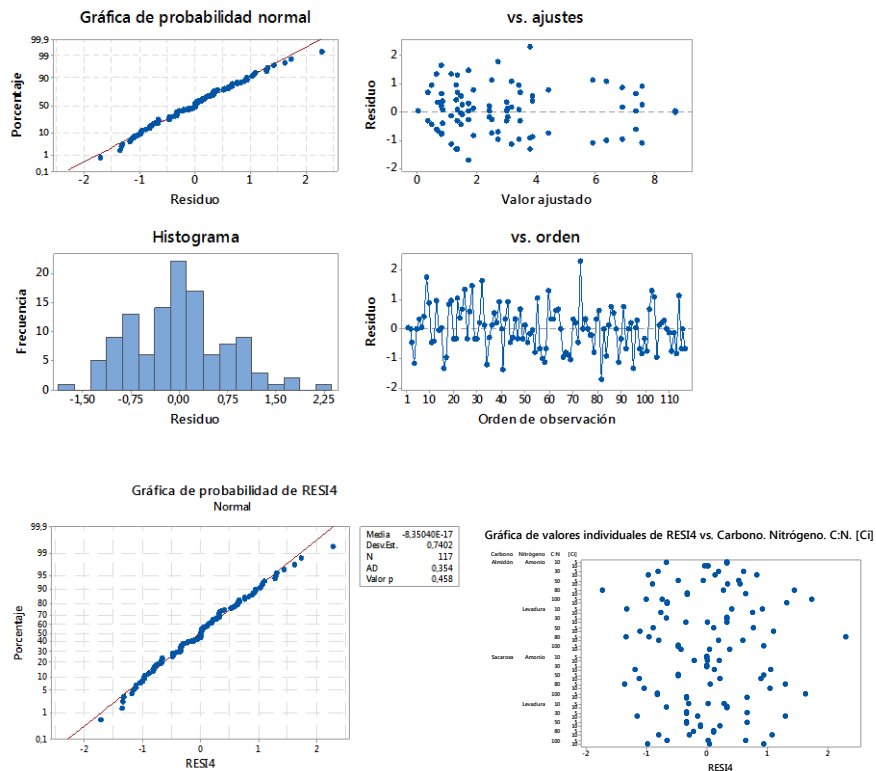
Prueba de varianzas iguales: RESI1 vs. Carbono. Nitrógeno. C:N. [Ci]

Hipótesis nula Todas las varianzas son iguales
Hipótesis alterna Por lo menos una varianza es diferente
Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Método	Estadística de prueba	Valor p
Levene	0,65	0,934

H. Anexo: Gráficos de diagnóstico Tolerancia transformada

Gráficas de residuos para ToleranciaTransformada



Prueba de varianzas iguales: RESI4 vs. Carbono. Nitrógeno. C:N. [Ci]

Hipótesis nula Todas las varianzas son iguales

Hipótesis alterna Por lo menos una varianza es diferente

Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Método	Estadística de prueba	Valor p
Levene	0,58	0,966

I. Anexo: Regresión factorial y gráficos de efectos principales e interacciones: Biomasa

Bienvenido a Minitab, presione F1 para obtener ayuda.

Regresión factorial general: Log (10) Biomasa vs. Carbono. Nitrógeno. C:N. [Ci]

Información del factor

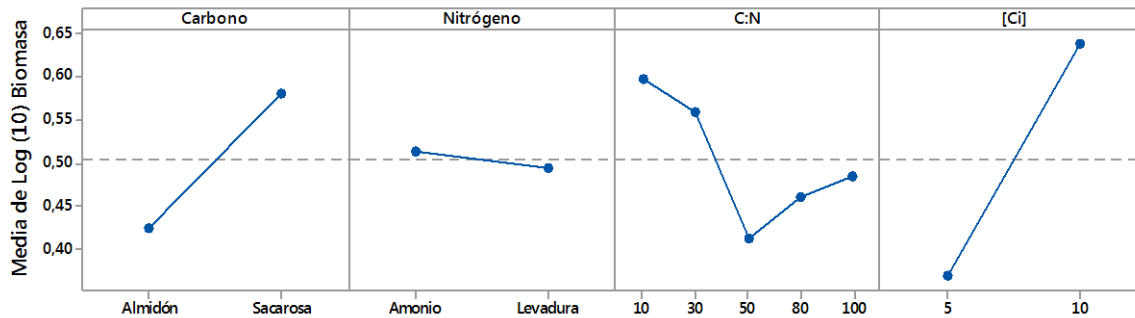
Factor	Niveles	Valores
Carbono	2	Almidón. Sacarosa
Nitrógeno	2	Amonio. Levadura
C:N	5	10. 30. 50. 80. 100
[Ci]	2	5. 10

Análisis de Varianza

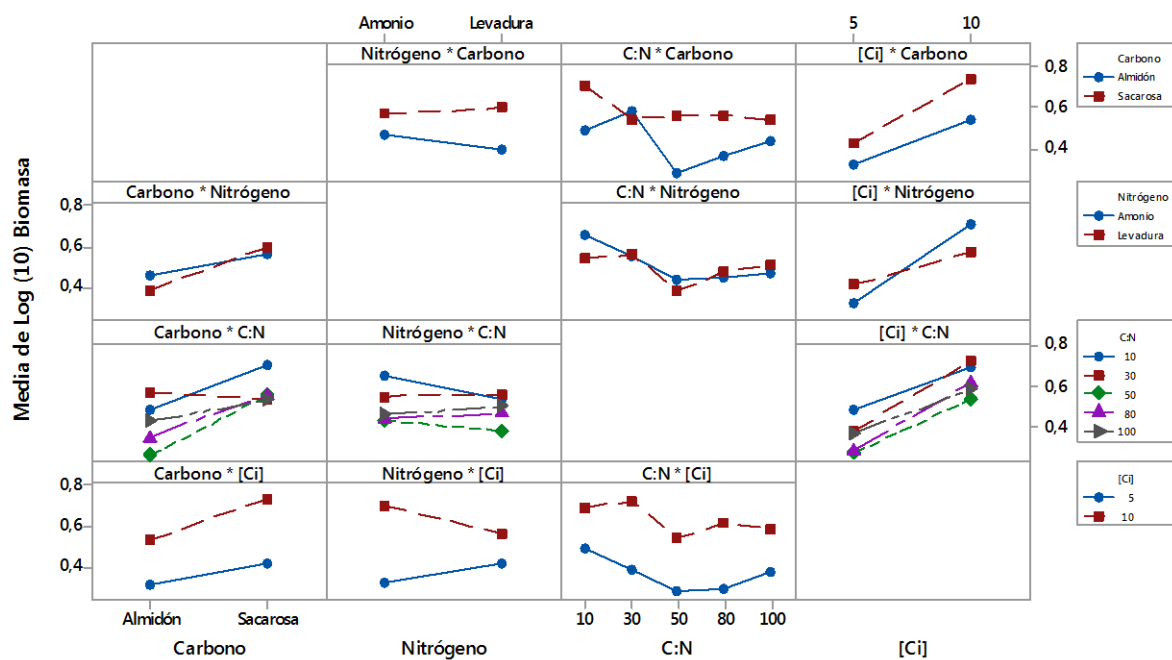
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	39	5,16413	0,13241	19,69	0,000
Lineal	7	3,29765	0,47109	70,05	0,000
Carbono	1	0,69963	0,69963	104,03	0,000
Nitrógeno	1	0,01051	0,01051	1,56	0,215
C:N	4	0,52288	0,13072	19,44	0,000
[Ci]	1	2,08467	2,08467	309,97	0,000
Interacciones de 2 términos	15	1,07543	0,07170	10,66	0,000
Carbono*Nitrógeno	1	0,07474	0,07474	11,11	0,001
Carbono*C:N	4	0,37341	0,09335	13,88	0,000
Carbono*[Ci]	1	0,08404	0,08404	12,50	0,001
Nitrógeno*C:N	4	0,09496	0,02374	3,53	0,011
Nitrógeno*[Ci]	1	0,36435	0,36435	54,17	0,000
C:N*[Ci]	4	0,09289	0,02322	3,45	0,012
Interacciones de 3 términos	13	0,47796	0,03677	5,47	0,000
Carbono*Nitrógeno*C:N	4	0,23684	0,05921	8,80	0,000
Carbono*Nitrógeno*[Ci]	1	0,00419	0,00419	0,62	0,432
Carbono*C:N*[Ci]	4	0,02387	0,00597	0,89	0,476
Nitrógeno*C:N*[Ci]	4	0,21722	0,05431	8,07	0,000
Interacciones de 4 términos	4	0,12568	0,03142	4,67	0,002
Carbono*Nitrógeno*C:N*[Ci]	4	0,12568	0,03142	4,67	0,002
Error	76	0,51114	0,00673		
Total	115	5,67527			
Resumen del modelo					

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,0820092	90,99%	86,37%	78,22%

Gráfica de efectos principales para Log (10) Biomasa
Medias ajustadas



Gráfica de interacción para Log (10) Biomasa
Medias ajustadas



J. Anexo: Regresión factorial, gráficos de efectos principales e interacciones número de conidios

Regresión factorial general: Log 10 Número de conidio vs. Carbono. Nitrógeno. C:N. [Ci]

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Carbono	2	Almidón. Sacarosa
Nitrógeno	2	Amonio. Levadura
C:N	5	10. 30. 50. 80. 100
[Ci]	2	5. 10

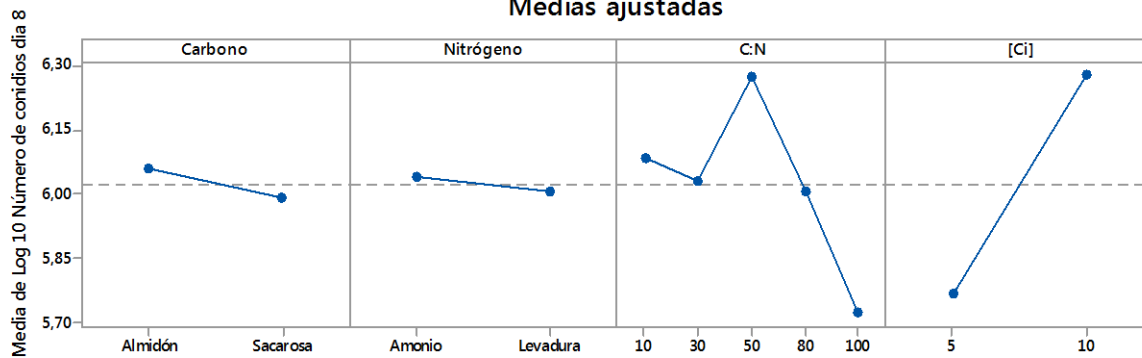
Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	39	42,1861	1,08170	15,57	0,000
Lineal	7	11,6793	1,66848	24,02	0,000
Carbono	1	0,1369	0,13689	1,97	0,164
Nitrógeno	1	0,0422	0,04220	0,61	0,438
C:N	4	3,7566	0,93914	13,52	0,000
[Ci]	1	7,7437	7,74368	111,48	0,000
Interacciones de 2 términos	15	21,1023	1,40682	20,25	0,000
Carbono*Nitrógeno	1	6,0263	6,02631	86,76	0,000
Carbono*C:N	4	2,5823	0,64557	9,29	0,000
Carbono*[Ci]	1	0,6881	0,68814	9,91	0,002
Nitrógeno*C:N	4	2,9766	0,74415	10,71	0,000
Nitrógeno*[Ci]	1	5,1033	5,10326	73,47	0,000
C:N*[Ci]	4	3,7257	0,93143	13,41	0,000
Interacciones de 3 términos	13	8,4616	0,65089	9,37	0,000
Carbono*Nitrógeno*C:N	4	1,3686	0,34216	4,93	0,001
Carbono*Nitrógeno*[Ci]	1	0,1444	0,14443	2,08	0,153
Carbono*C:N*[Ci]	4	2,2259	0,55646	8,01	0,000
Nitrógeno*C:N*[Ci]	4	4,7227	1,18067	17,00	0,000
Interacciones de 4 términos	4	0,9429	0,23572	3,39	0,013
Carbono*Nitrógeno*C:N*[Ci]	4	0,9429	0,23572	3,39	0,013
Error	80	5,5569	0,06946		
Total	119	47,7430			

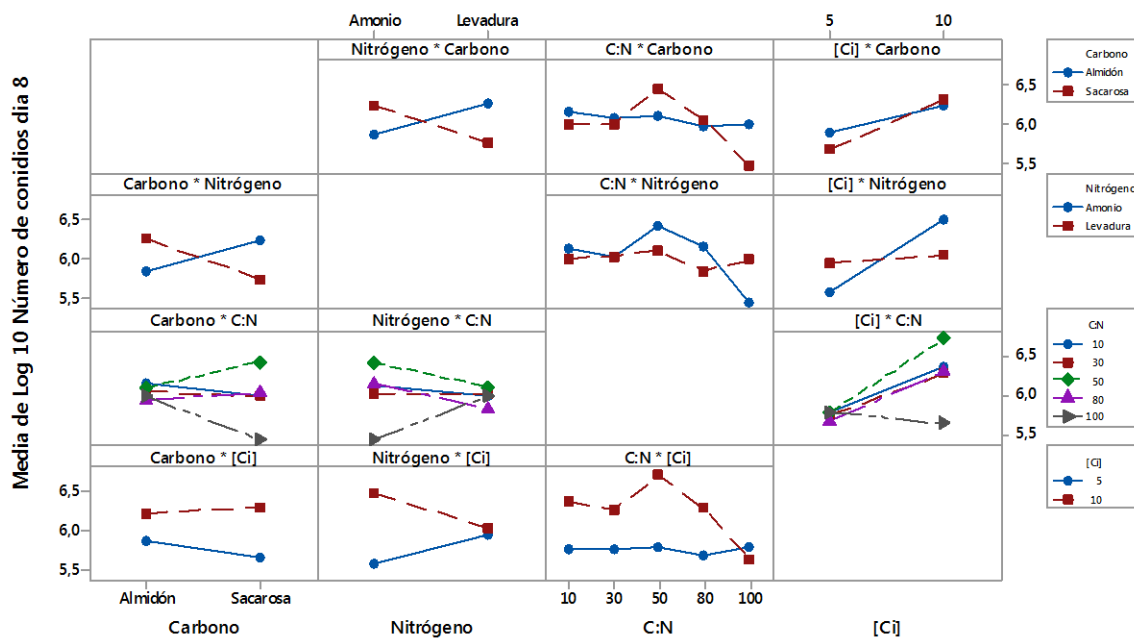
Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,263554	88,36%	82,69%	73,81%

Gráfica de efectos principales para Log 10 Número de conidios día 8
Medias ajustadas



Gráfica de interacción para Log 10 Número de conidios día 8
Medias ajustadas



K. Anexo: Gráficos de efectos principales e interacciones Germinación

Regresión factorial general: % Germinación Transformada vs. Carbono. Nitrógeno. C:N. [Ci]

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Carbono	2	Almidón. Sacarosa
Nitrógeno	2	Amonio. Levadura
C:N	5	10. 30. 50. 80. 100
[Ci]	2	5. 10

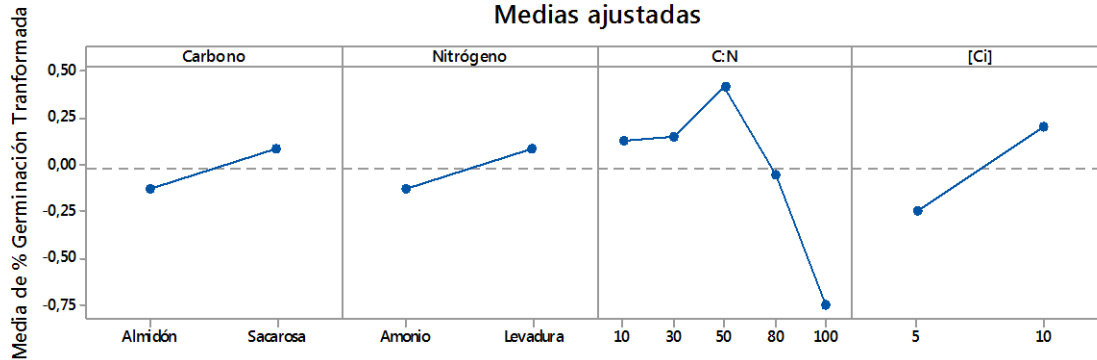
Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	39	92,556	2,3732	10,58	0,000
Lineal	7	27,628	3,9468	17,60	0,000
Carbono	1	1,357	1,3572	6,05	0,016
Nitrógeno	1	1,361	1,3614	6,07	0,016
C:N	4	18,741	4,6854	20,89	0,000
[Ci]	1	6,051	6,0510	26,98	0,000
Interacciones de 2 términos	15	40,836	2,7224	12,14	0,000
Carbono*Nitrógeno	1	2,523	2,5231	11,25	0,001
Carbono*C:N	4	7,125	1,7813	7,94	0,000
Carbono*[Ci]	1	2,285	2,2850	10,19	0,002
Nitrógeno*C:N	4	14,389	3,5972	16,04	0,000
Nitrógeno*[Ci]	1	13,159	13,1591	58,67	0,000
C:N*[Ci]	4	1,924	0,4809	2,14	0,083
Interacciones de 3 términos	13	18,846	1,4497	6,46	0,000
Carbono*Nitrógeno*C:N	4	10,009	2,5022	11,16	0,000
Carbono*Nitrógeno*[Ci]	1	1,126	1,1264	5,02	0,028
Carbono*C:N*[Ci]	4	5,355	1,3388	5,97	0,000
Nitrógeno*C:N*[Ci]	4	2,385	0,5964	2,66	0,039
Interacciones de 4 términos	4	7,279	1,8197	8,11	0,000
Carbono*Nitrógeno*C:N*[Ci]	4	7,279	1,8197	8,11	0,000
Error	79	17,718	0,2243		
Total	118	110,274			

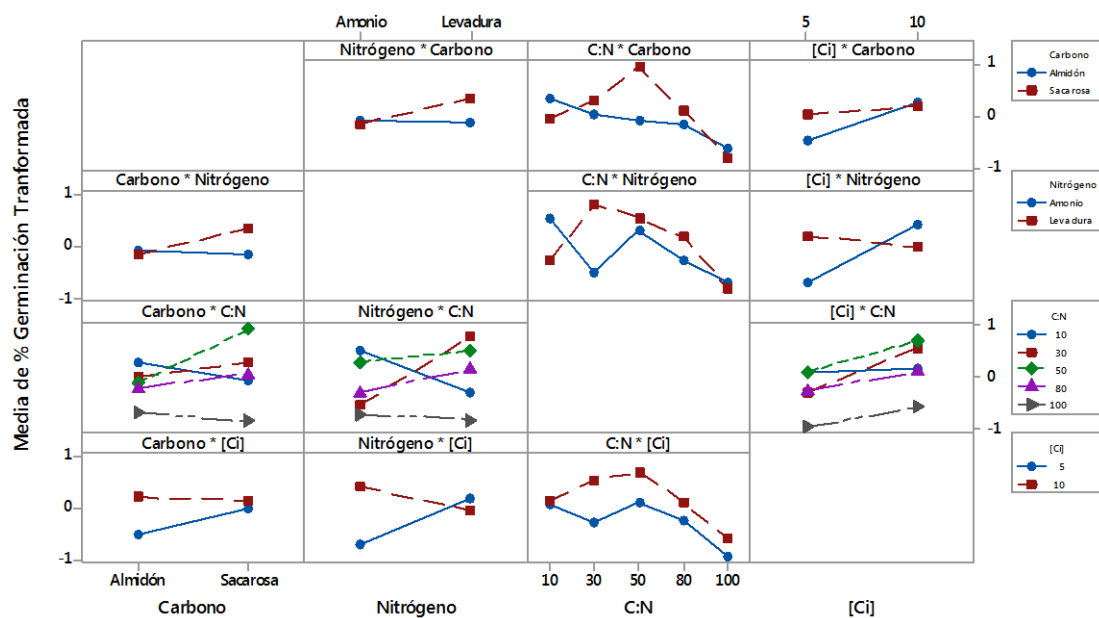
Resumen del modelo

S	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,473586	83,93%	76,00%

Gráfica de efectos principales para % Germinación Transformada
Medias ajustadas



Gráfica de interacción para % Germinación Transformada
Medias ajustadas



L. Anexo: Gráficos de efectos principales e interacciones Tolerancia transformada

Regresión factorial general: Tolerancia Transformada vs. Carbono. Nitrógeno. C:N. [Ci]

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Carbono	2	Almidón. Sacarosa
Nitrógeno	2	Amonio. Levadura
C:N	5	10. 30. 50. 80. 100
[Ci]	2	5. 10

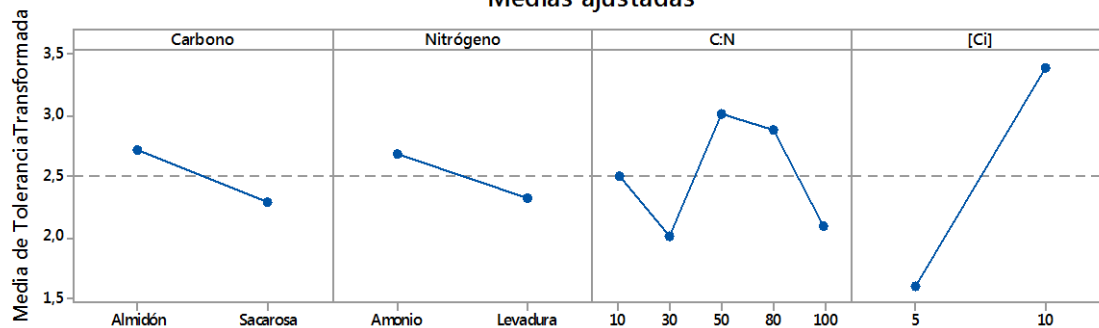
Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	39	596,477	15,2943	18,53	0,000
Lineal	7	119,957	17,1367	20,76	0,000
Carbono	1	5,319	5,3192	6,44	0,013
Nitrógeno	1	3,904	3,9037	4,73	0,033
C:N	4	19,162	4,7904	5,80	0,000
[Ci]	1	93,473	93,4735	113,23	0,000
Interacciones de 2 términos	15	312,484	20,8322	25,24	0,000
Carbono*Nitrógeno	1	5,057	5,0573	6,13	0,016
Carbono*C:N	4	75,292	18,8230	22,80	0,000
Carbono*[Ci]	1	7,816	7,8157	9,47	0,003
Nitrógeno*C:N	4	40,401	10,1004	12,24	0,000
Nitrógeno*[Ci]	1	70,018	70,0175	84,82	0,000
C:N*[Ci]	4	107,613	26,9033	32,59	0,000
Interacciones de 3 términos	13	148,187	11,3990	13,81	0,000
Carbono*Nitrógeno*C:N	4	73,629	18,4072	22,30	0,000
Carbono*Nitrógeno*[Ci]	1	11,266	11,2664	13,65	0,000
Carbono*C:N*[Ci]	4	47,776	11,9441	14,47	0,000
Nitrógeno*C:N*[Ci]	4	18,231	4,5577	5,52	0,001
Interacciones de 4 términos	4	29,676	7,4189	8,99	0,000
Carbono*Nitrógeno*C:N*[Ci]	4	29,676	7,4189	8,99	0,000
Error	77	63,563	0,8255		
Total	116	660,040			

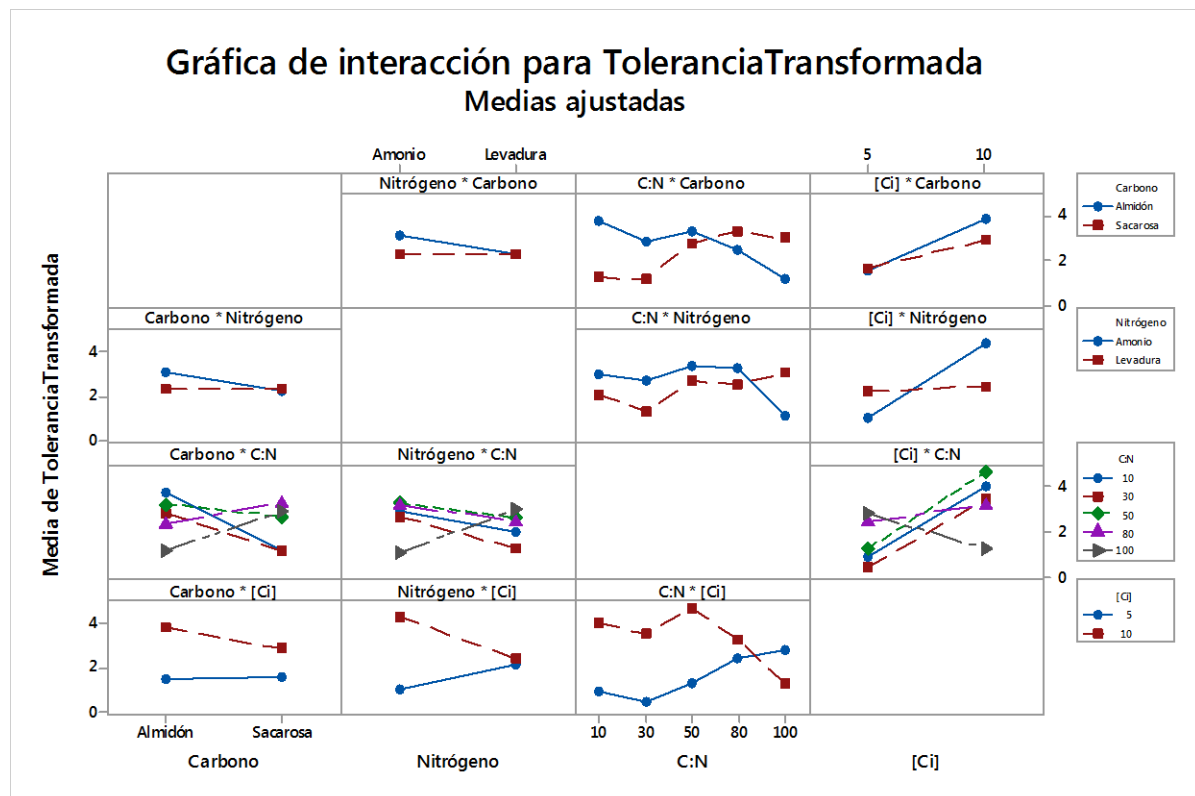
Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,908566	90,37%	85,49%	76,80%

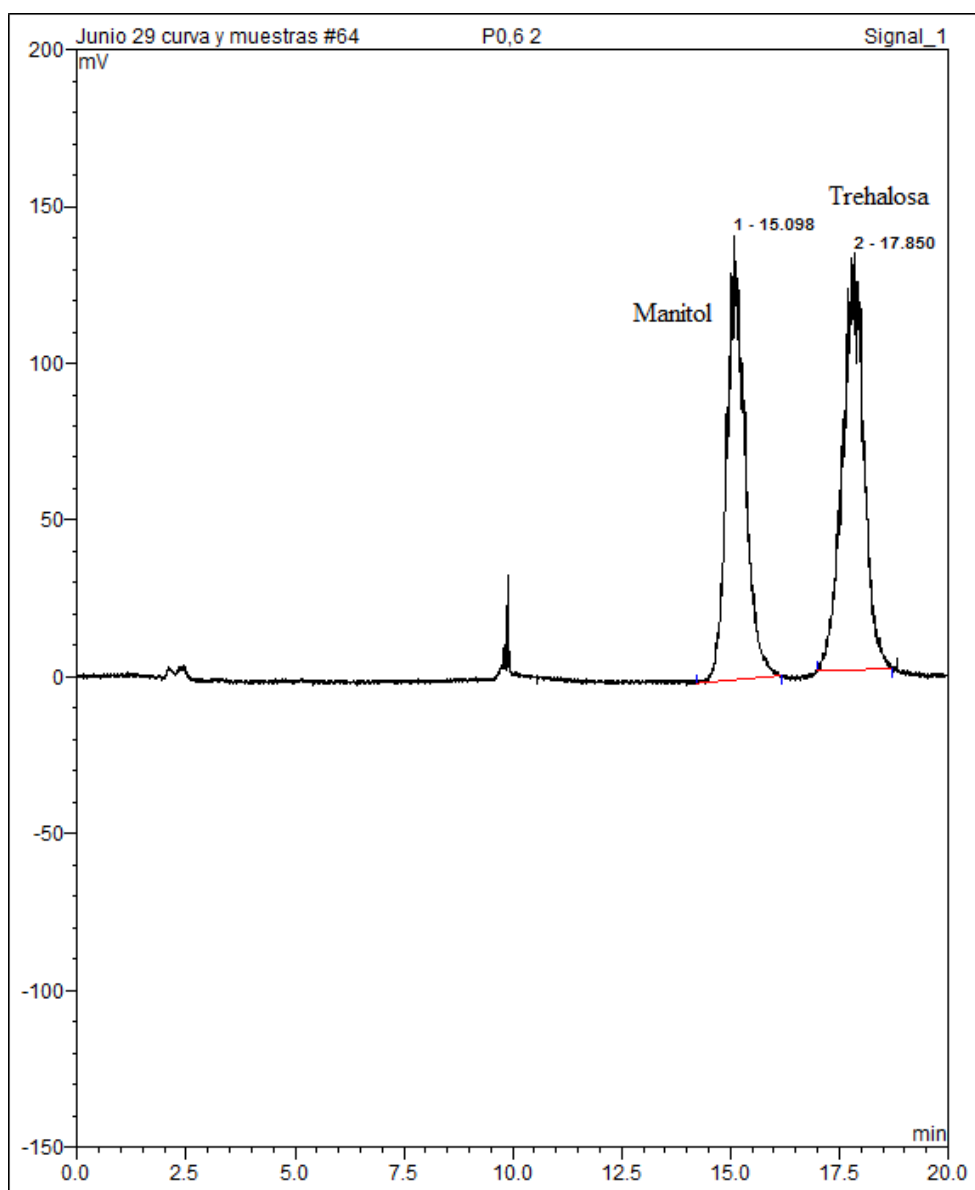
Gráfica de efectos principales para ToleranciaTransformada
Medias ajustadas



Gráfica de interacción para ToleranciaTransformada
Medias ajustadas



M. Anexo: Cromatograma



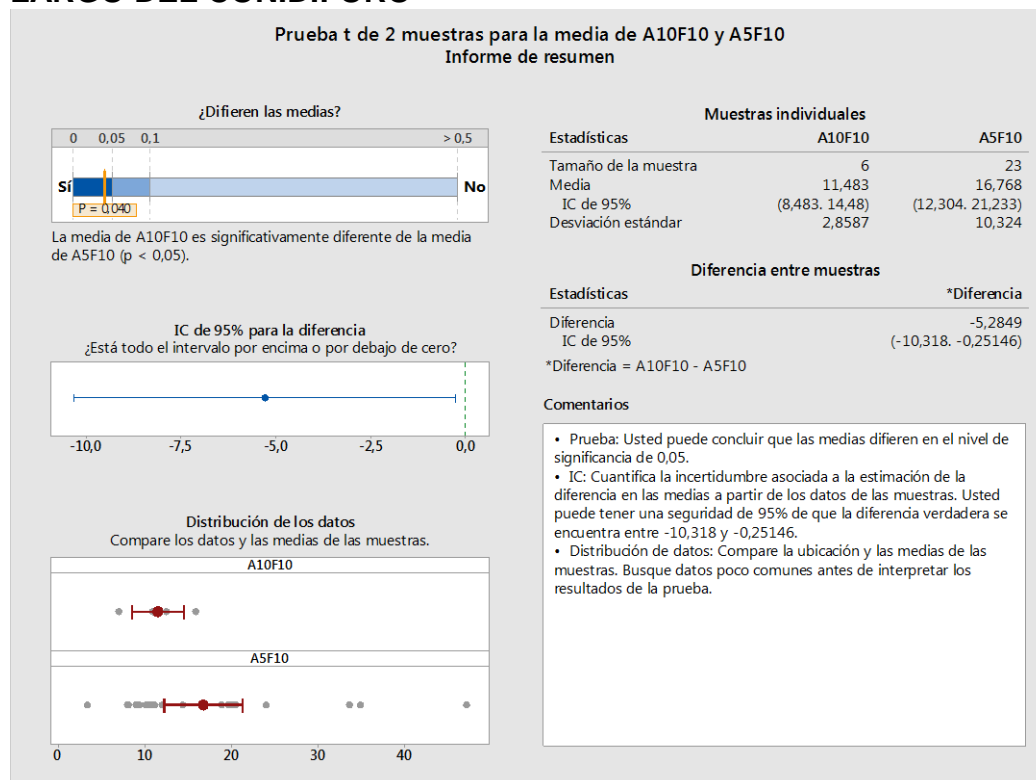
N. Anexo: Medios seleccionados para caracterización microscópica y cuantificación de manitol y trehalosa

Medios de cultivos seleccionados para la producción de conidios y determinación de trehalosa, manitol y superficie de la pared

No.	Nombre del medio de cultivo	Fuente de Carbono (g.L ⁻¹)	Fuente de Nitrógeno (g.L ⁻¹)	Relación C:N
1	S5-E100	Sacarosa (5.00)	Extracto de levadura (0.678)	100:1
2	S10-E10	Sacarosa (10.00)	Extracto de levadura (6.781)	10:1
3	S10-F50	Sacarosa (10.00)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (0.463)	50:1
4	S5-F10	Sacarosa (5.00)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (1.157)	10:1
5	A10-E50	Harina de almidón(10.00)	Extracto de levadura (1.254)	50:1
6	A5-E50	Harina de almidón(5.00)	Extracto de levadura (0.627)	50:1
7	A10-F10	Harina de almidón(10.00)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (2.149)	10:1
8	A5-F10	Harina de almidón(5.00)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (1.075)	10:1

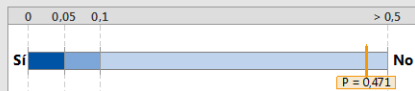
O. Anexo: Análisis estadístico para caracterización microscópica de conidióforos y conidios

LARGO DEL CONIDIFORO



Prueba t de 2 muestras para la media de A10E50 y ASE50 Informe de resumen

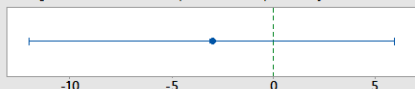
¿Difieren las medias?



La media de A10E50 no es significativamente diferente de la media de ASE50 ($p > 0,05$).

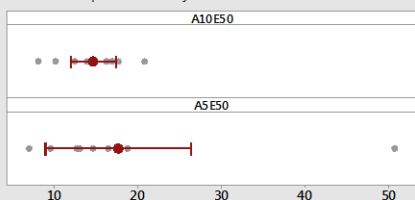
IC de 95% para la diferencia

¿Está todo el intervalo por encima o por debajo de cero?



Distribución de los datos

Compare los datos y las medias de las muestras.



Muestras individuales

Estadísticas	A10E50	ASE50
Tamaño de la muestra	10	10
Media	14,646	17,67
IC de 95%	(11,96, 17,34)	(8,9382, 26,402)
Desviación estándar	3,7607	12,206

Diferencia entre muestras

Estadísticas	*Diferencia
Diferencia	-3,024
IC de 95%	(-12,023, 5,9755)

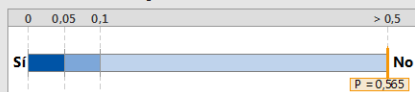
*Diferencia = A10E50 - ASE50

Comentarios

- Prueba: No existe suficiente evidencia para concluir que las medias difieren en el nivel de significancia de 0,05.
- IC: Cuantifica la incertidumbre asociada a la estimación de la diferencia en las medias a partir de los datos de las muestras. Usted puede tener una seguridad de 95% de que la diferencia verdadera se encuentra entre -12,023 y 5,9755.
- Distribución de datos: Compare la ubicación y las medias de las muestras. Busque datos poco comunes antes de interpretar los resultados de la prueba.

Prueba t de 2 muestras para la media de S10F50 y SSF10 Informe de resumen

¿Difieren las medias?



La media de S10F50 no es significativamente diferente de la media de SSF10 ($p > 0,05$).

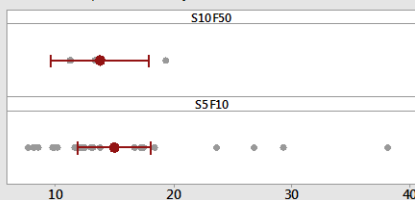
IC de 95% para la diferencia

¿Está todo el intervalo por encima o por debajo de cero?



Distribución de los datos

Compare los datos y las medias de las muestras.



Muestras individuales

Estadísticas	S10F50	SSF10
Tamaño de la muestra	5	25
Media	13,744	14,987
IC de 95%	(9,598, 17,89)	(11,933, 18,041)
Desviación estándar	3,3388	7,3980

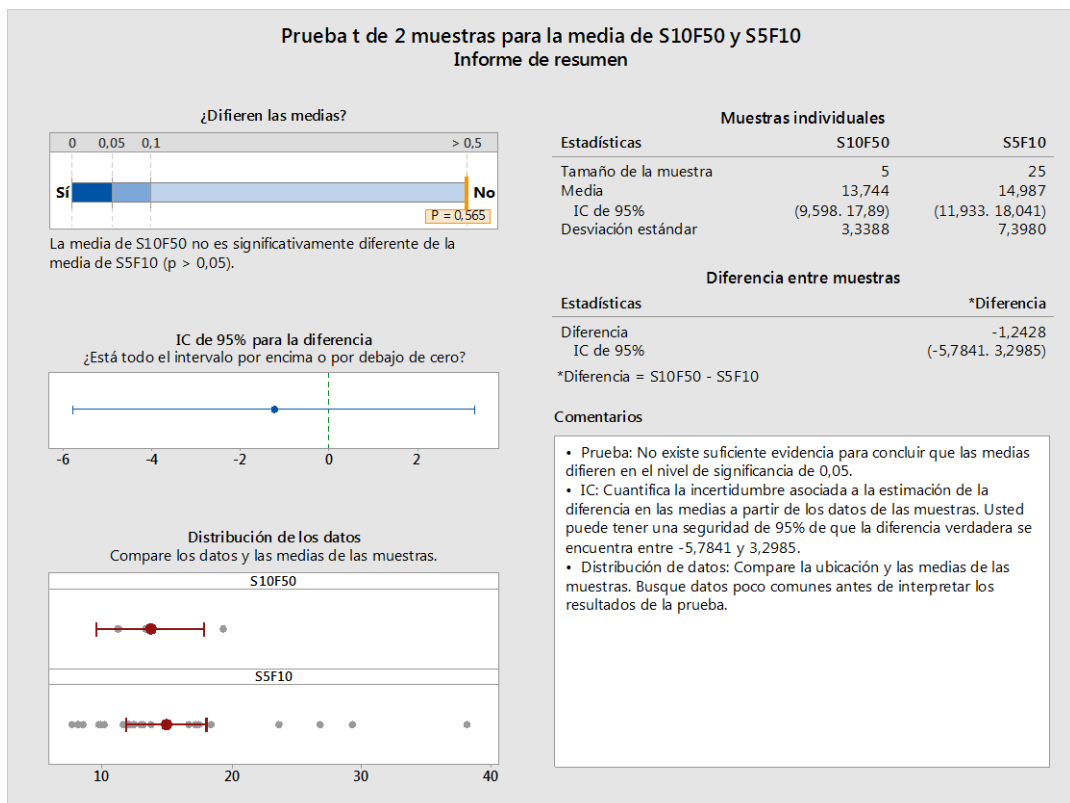
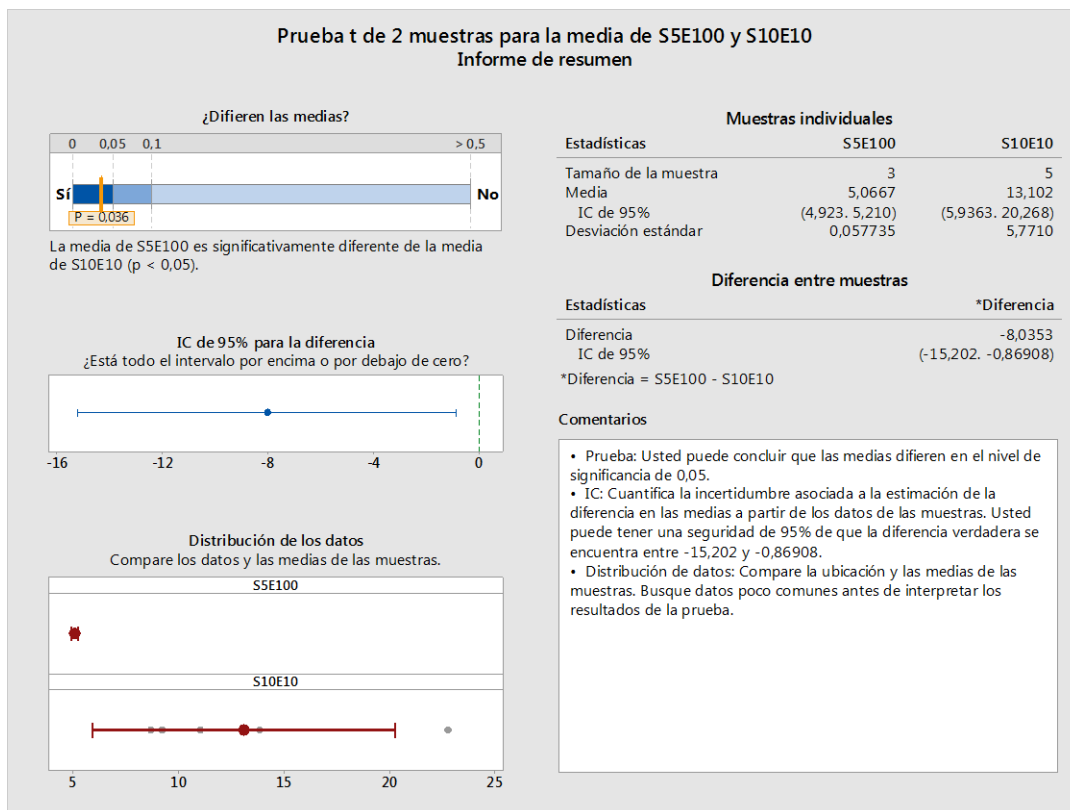
Diferencia entre muestras

Estadísticas	*Diferencia
Diferencia	-1,2428
IC de 95%	(-5,7841, 3,2985)

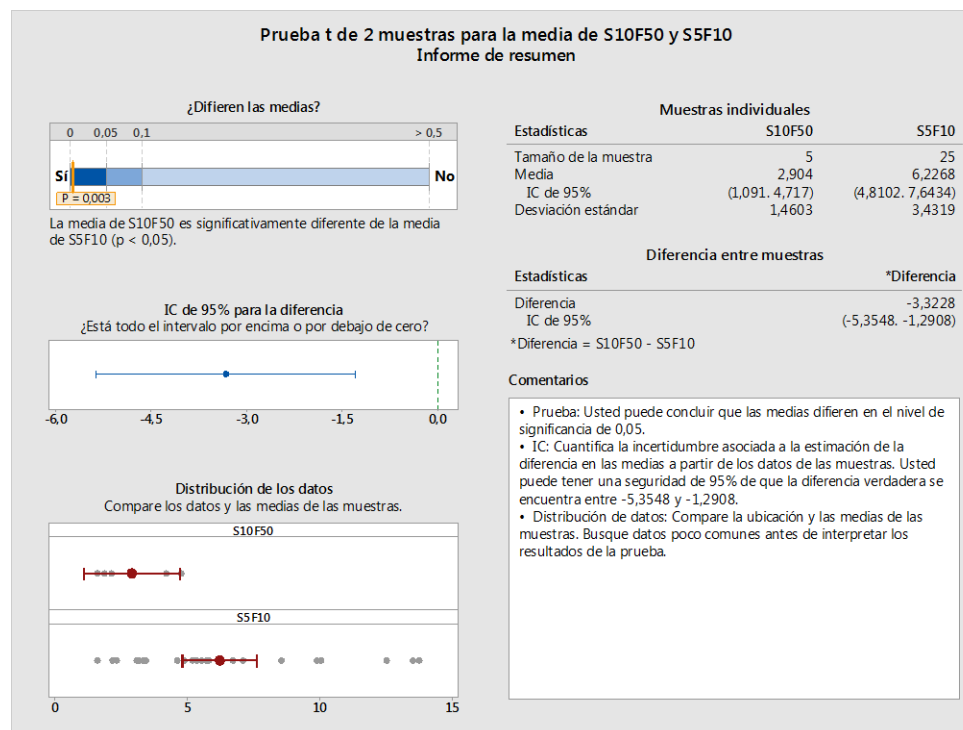
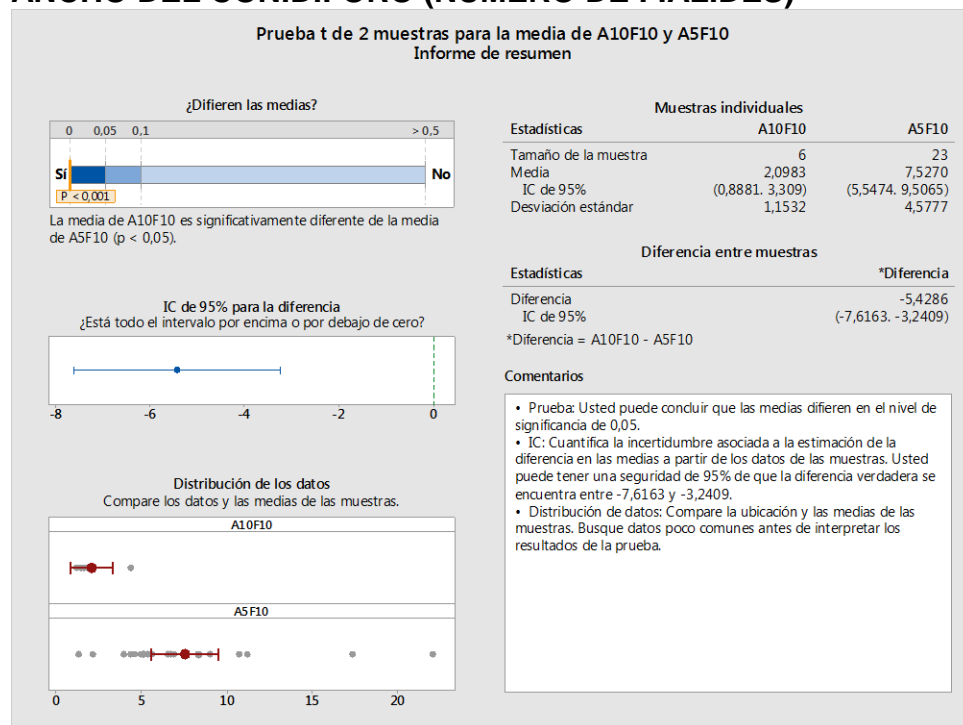
*Diferencia = S10F50 - SSF10

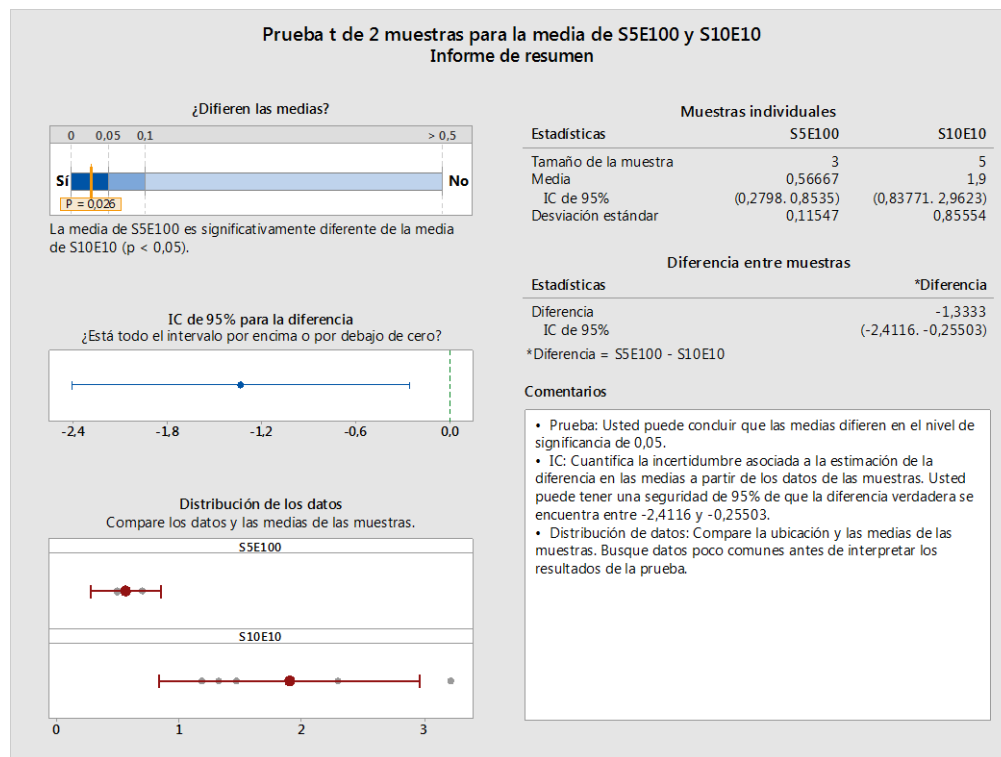
Comentarios

- Prueba: No existe suficiente evidencia para concluir que las medias difieren en el nivel de significancia de 0,05.
- IC: Cuantifica la incertidumbre asociada a la estimación de la diferencia en las medias a partir de los datos de las muestras. Usted puede tener una seguridad de 95% de que la diferencia verdadera se encuentra entre -5,7841 y 3,2985.
- Distribución de datos: Compare la ubicación y las medias de las muestras. Busque datos poco comunes antes de interpretar los resultados de la prueba.

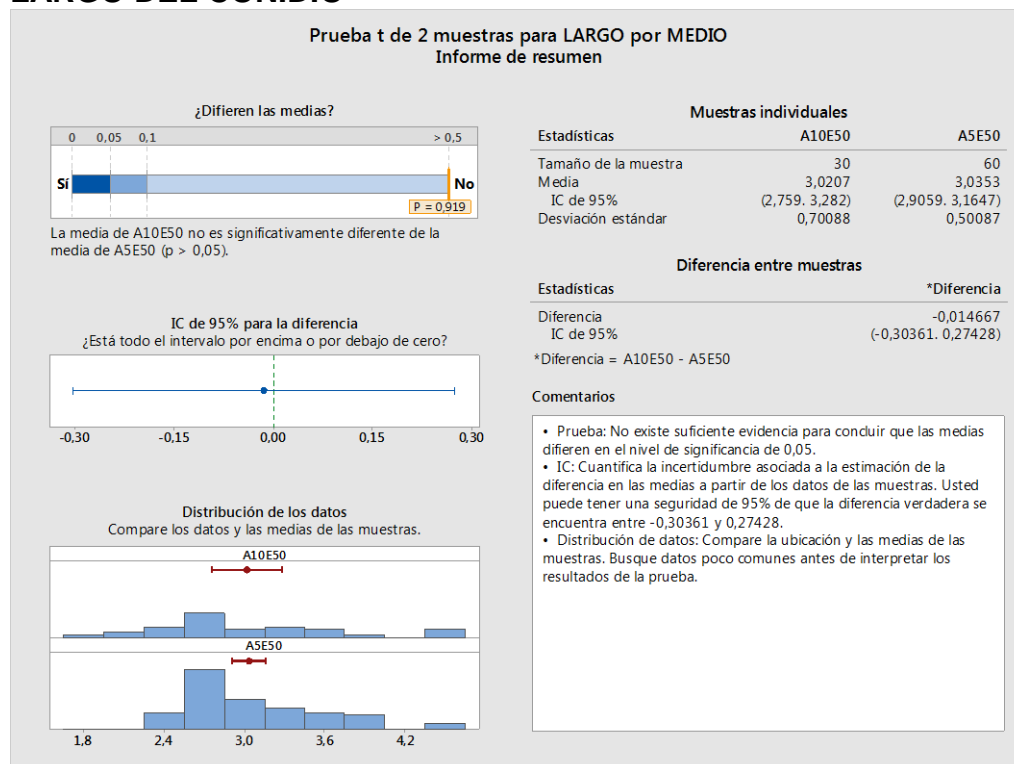


ANCHO DEL CONIDIFORO (NUMERO DE FIÁLIDES)



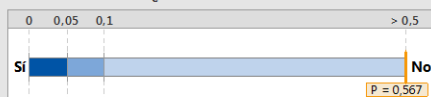


LARGO DEL CONIDIO



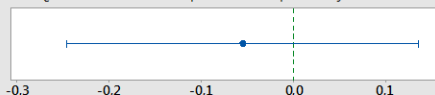
Prueba t de 2 muestras para LARGO por MEDIO Informe de resumen

¿Difieren las medias?



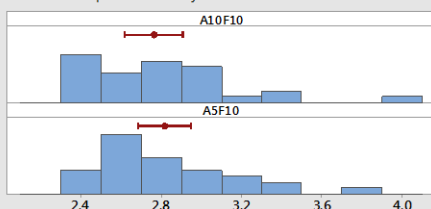
La media de A10F10 no es significativamente diferente de la media de A5F10 ($p > 0,05$).

IC de 95% para la diferencia
¿Está todo el intervalo por encima o por debajo de cero?



Distribución de los datos

Compare los datos y las medias de las muestras.



Muestras individuales

Estadísticas	A10F10	A5F10
Tamaño de la muestra	30	30
Media	2,7637	2,8187
IC de 95%	(2,618, 2,909)	(2,6885, 2,9489)
Desviación estándar	0,38927	0,34871

Diferencia entre muestras

Estadísticas	*Diferencia
Diferencia	-0,055
IC de 95%	(-0,24607, 0,13607)

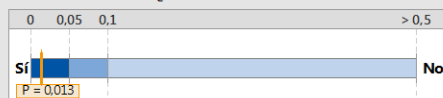
*Diferencia = A10F10 - A5F10

Comentarios

- Prueba: No existe suficiente evidencia para concluir que las medias difieren en el nivel de significancia de 0,05.
- IC: Cuantifica la incertidumbre asociada a la estimación de la diferencia en las medias a partir de los datos de las muestras. Usted puede tener una seguridad de 95% de que la diferencia verdadera se encuentra entre -0,24607 y 0,13607.
- Distribución de datos: Compare la ubicación y las medias de las muestras. Busque datos poco comunes antes de interpretar los resultados de la prueba.

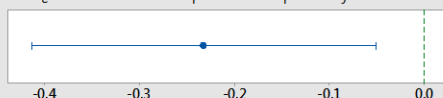
Prueba t de 2 muestras para LARGO por MEDIO Informe de resumen

¿Difieren las medias?



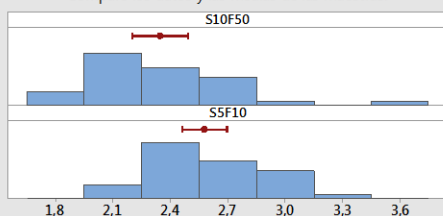
La media de S10F50 es significativamente diferente de la media de S5F10 ($p < 0,05$).

IC de 95% para la diferencia
¿Está todo el intervalo por encima o por debajo de cero?



Distribución de los datos

Compare los datos y las medias de las muestras.



Muestras individuales

Estadísticas	S10F50	S5F10
Tamaño de la muestra	30	30
Media	2,3467	2,579
IC de 95%	(2,203, 2,491)	(2,4623, 2,6957)
Desviación estándar	0,38555	0,31263

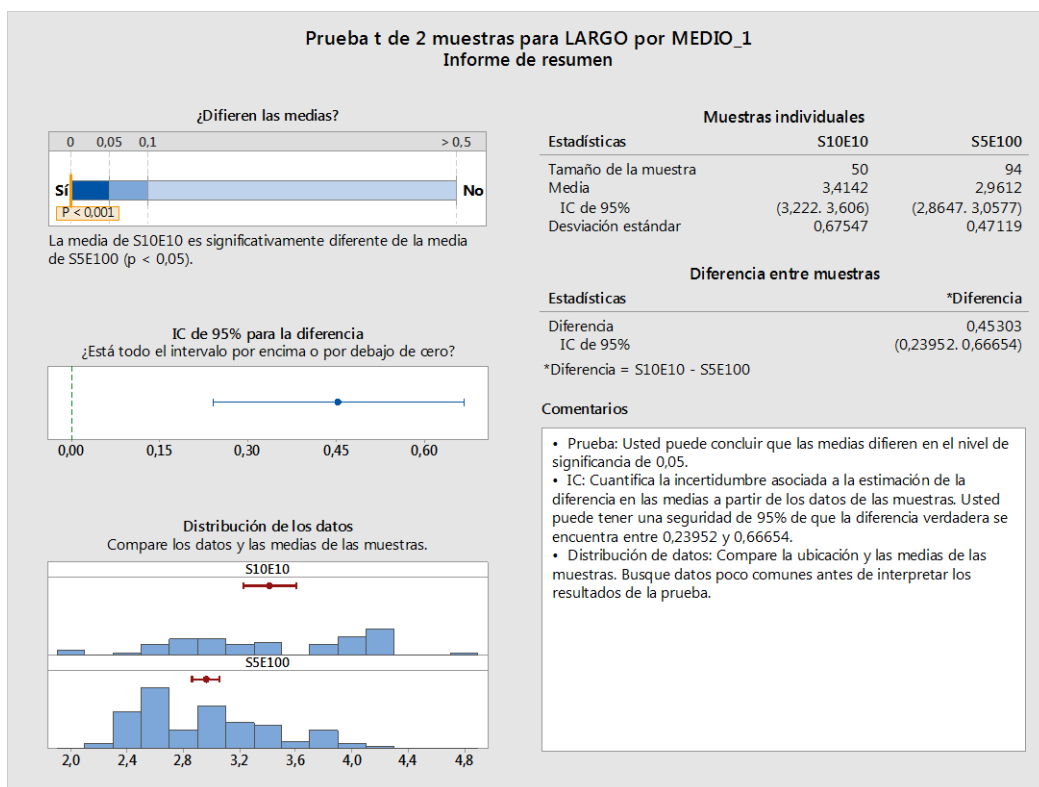
Diferencia entre muestras

Estadísticas	*Diferencia
Diferencia	-0,23233
IC de 95%	(-0,41395, -0,050715)

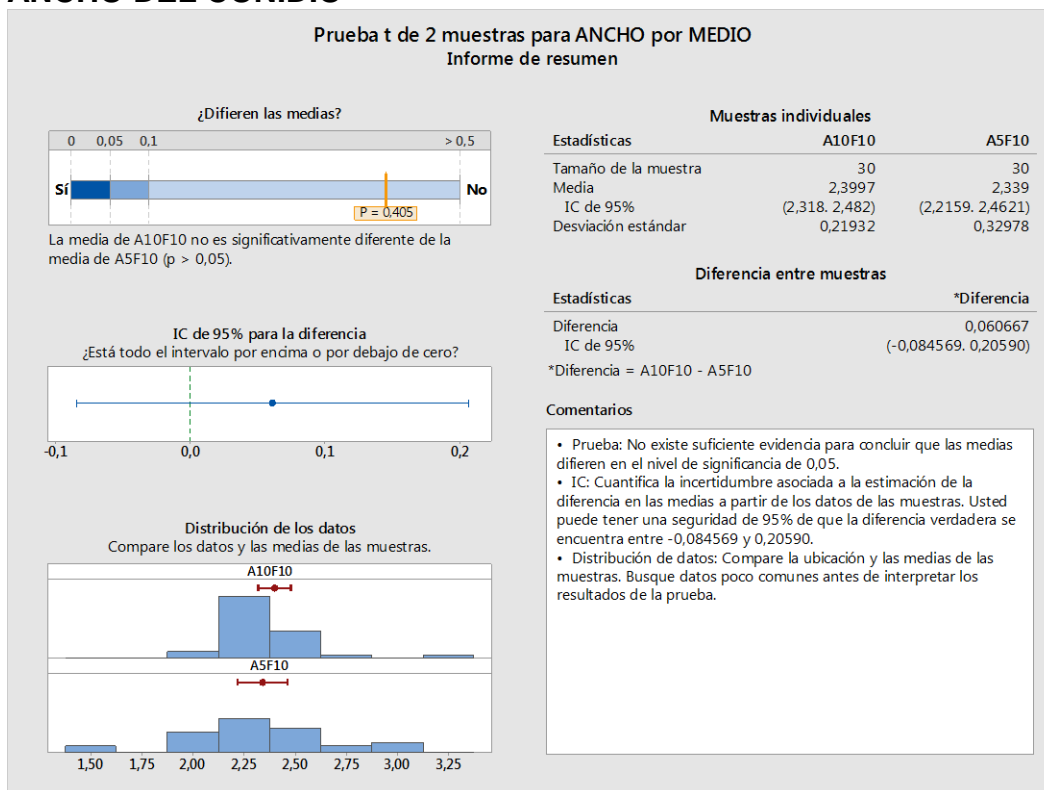
*Diferencia = S10F50 - S5F10

Comentarios

- Prueba: Usted puede concluir que las medias difieren en el nivel de significancia de 0,05.
- IC: Cuantifica la incertidumbre asociada a la estimación de la diferencia en las medias a partir de los datos de las muestras. Usted puede tener una seguridad de 95% de que la diferencia verdadera se encuentra entre -0,41395 y -0,050715.
- Distribución de datos: Compare la ubicación y las medias de las muestras. Busque datos poco comunes antes de interpretar los resultados de la prueba.

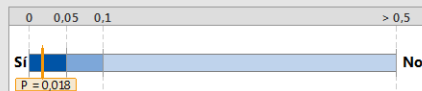


ANCHO DEL CONIDIO



Prueba t de 2 muestras para ANCHO por MEDIO
Informe de resumen

¿Difieren las medias?



La media de S10F50 es significativamente diferente de la media de S5F10 ($p < 0,05$).

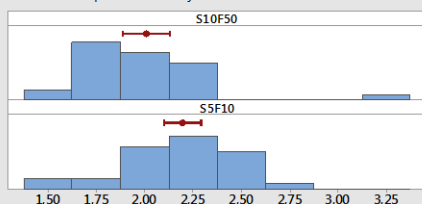
IC de 95% para la diferencia

¿Está todo el intervalo por encima o por debajo de cero?



Distribución de los datos

Compare los datos y las medias de las muestras.



Muestras individuales

Estadísticas	S10F50	S5F10
Tamaño de la muestra	30	30
Media	2,0097	2,195
IC de 95%	(1,888, 2,132)	(2,0986, 2,2914)
Desviación estándar	0,32668	0,25820

Diferencia entre muestras

Estadísticas	*Diferencia
Diferencia	-0,18533
IC de 95%	(-0,33769, -0,032979)

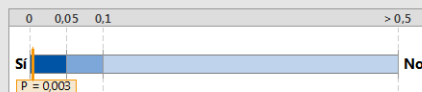
*Diferencia = S10F50 - S5F10

Comentarios

- Prueba: Usted puede concluir que las medias difieren en el nivel de significancia de 0,05.
- IC: Cuantifica la incertidumbre asociada a la estimación de la diferencia en las medias a partir de los datos de las muestras. Usted puede tener una seguridad de 95% de que la diferencia verdadera se encuentra entre -0,33769 y -0,032979.
- Distribución de datos: Compare la ubicación y las medias de las muestras. Busque datos poco comunes antes de interpretar los resultados de la prueba.

Prueba t de 2 muestras para ANCHO por MEDIO_1
Informe de resumen

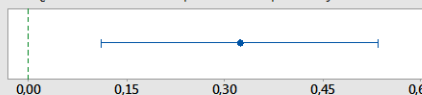
¿Difieren las medias?



La media de S10E10 es significativamente diferente de la media de S5E100 ($p < 0,05$).

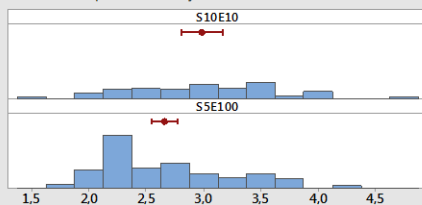
IC de 95% para la diferencia

¿Está todo el intervalo por encima o por debajo de cero?



Distribución de los datos

Compare los datos y las medias de las muestras.



Muestras individuales

Estadísticas	S10E10	S5E100
Tamaño de la muestra	50	94
Media	2,9842	2,6613
IC de 95%	(2,802, 3,167)	(2,5500, 2,7726)
Desviación estándar	0,64279	0,54340

Diferencia entre muestras

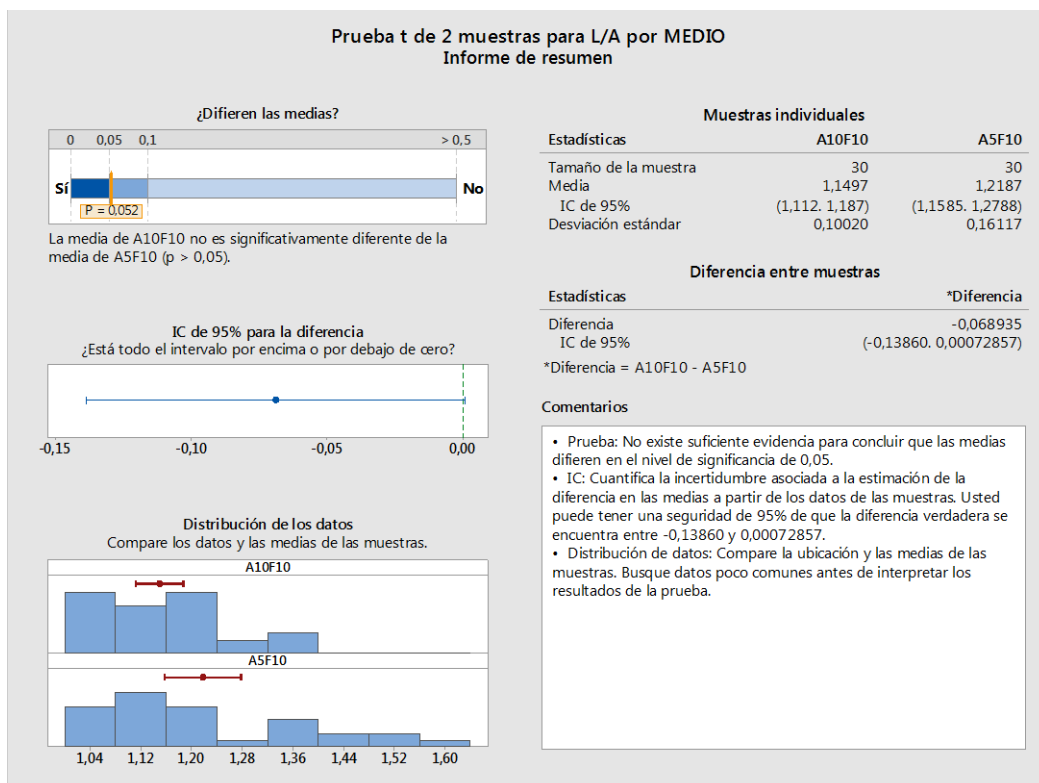
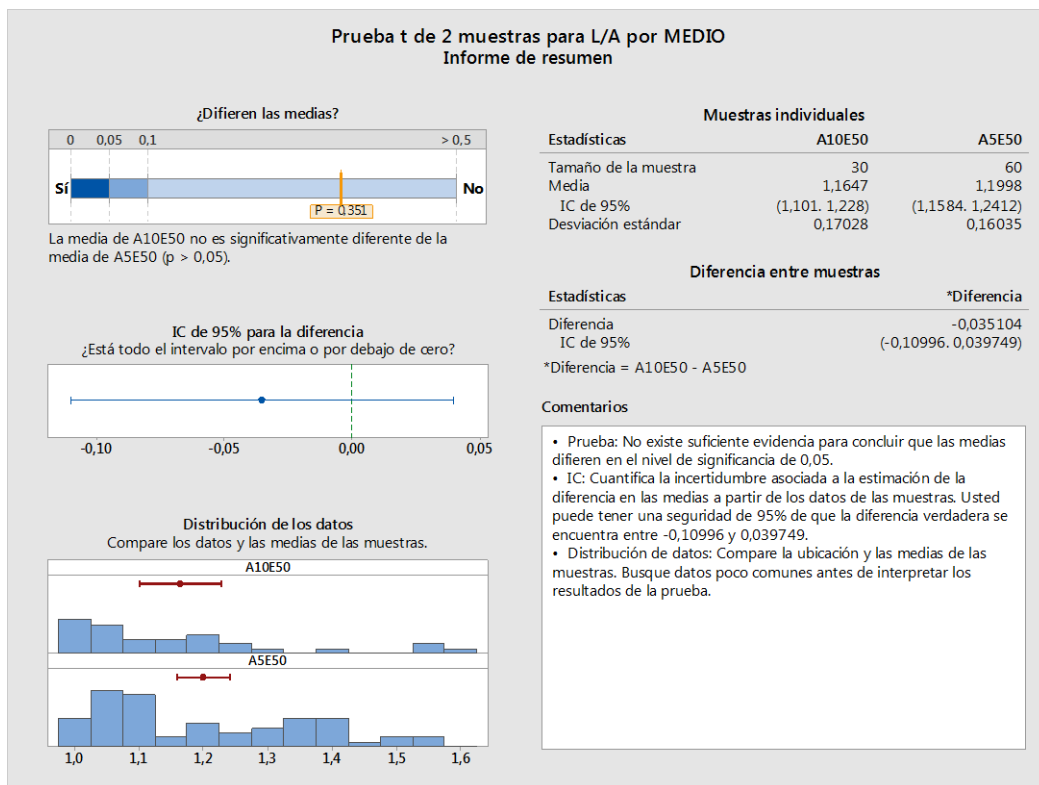
Estadísticas	*Diferencia
Diferencia	0,32292
IC de 95%	(0,11062, 0,53522)

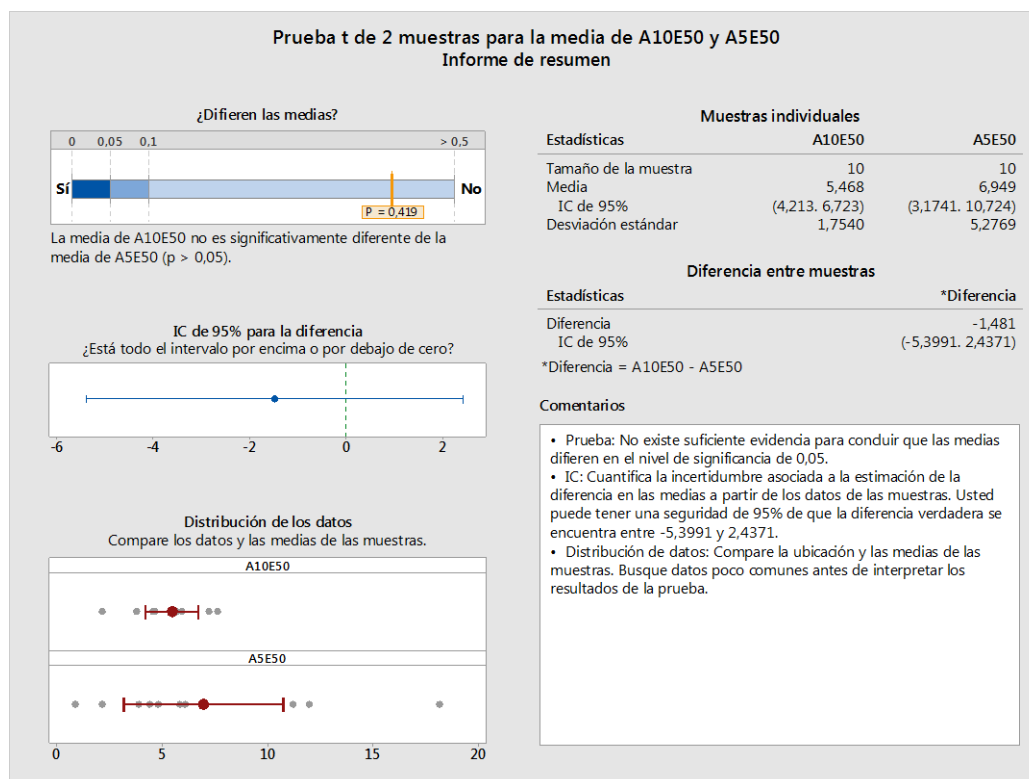
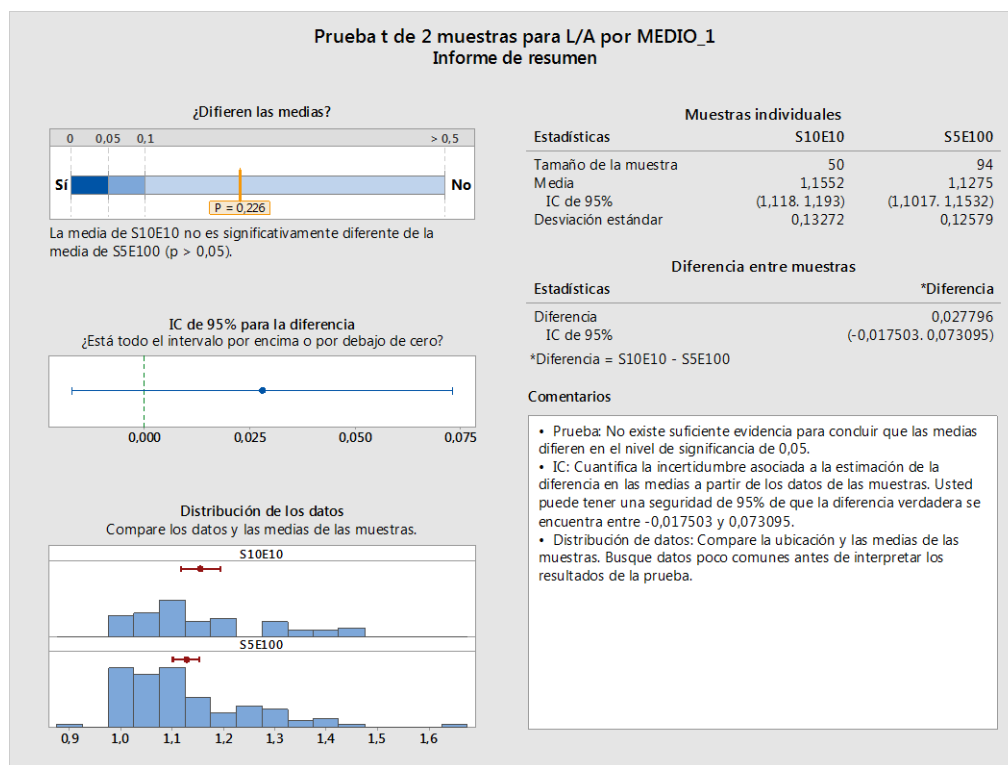
*Diferencia = S10E10 - S5E100

Comentarios

- Prueba: Usted puede concluir que las medias difieren en el nivel de significancia de 0,05.
- IC: Cuantifica la incertidumbre asociada a la estimación de la diferencia en las medias a partir de los datos de las muestras. Usted puede tener una seguridad de 95% de que la diferencia verdadera se encuentra entre 0,11062 y 0,53522.
- Distribución de datos: Compare la ubicación y las medias de las muestras. Busque datos poco comunes antes de interpretar los resultados de la prueba.

RELACION L/A





Bibliografía

- Abril, D., Navarro, E. & Abril, A., 2009. La paja de arroz: Consecuencias de su manejo y alternativas de aprovechamiento. *Agronomía*, 17(2), pp.69–79.
- Adour, L. et al., 2006. Amino acids as carbon, energy and nitrogen sources for *Penicillium camemberti*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 81(4), pp.573–579. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.1431>.
- Ballio, A., Di Vittorio, V. & Russi, S., 1964. The Isolation of Trehalose and Polyols from the Conidia of *Penicillium chrysogenum* Thorn. *ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS*, 107, pp.177–183.
- Bockelmann, W. et al., 1999. Sporulation of *Penicillium camemberti* in submerged batch culture. *Systematic and applied microbiology*, 22(3), pp.479–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10553300>.
- Böhm, J. et al., 2013. Sexual reproduction and mating-type – mediated strain development in the penicillin-producing fungus *Penicillium chrysogenum*. *Pnas*, 110(4), pp.1476–1481.
- Boualem, K. et al., 2008. Cloning and expression of genes involved in conidiation and surface properties of *Penicillium camemberti* grown in liquid and solid cultures. *Research in microbiology*, 159(2), pp.110–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18093806>.
- Boualem, K. et al., 2016. Conidiation of *Penicillium camemberti* in submerged liquid cultures is dependent on the nitrogen source. *Biotechnology Letters*, 38(2), pp.329–335.
- Boualem, K. et al., 2014a. Production of conidia of *Penicillium camemberti* in liquid medium through microcycles of conidiation. *Biotechnology Letters*.
- Boualem, K. et al., 2014b. Production of conidia of *Penicillium camemberti* in liquid medium through microcycles of conidiation. *Biotechnology Letters*, 36(11), pp.2239–2243.
- Boyle, J., 2005. *Lehninger principles of biochemistry* (4th ed.): Nelson, D., and Cox, M.

- Biochemistry and Molecular Biology Education*, 33(1), pp.74–75. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/bmb.2005.494033010419> [Accessed January 19, 2017].
- Camici, L. et al., 1952. OBSERVATIONS ON PENICILLIUM CHRYSOGENUM IN SUBMERGED CULTURE 1. Mycelial Growth and Autolysis. *Bull. Org. mond. Sant Bull. World Hlth Org*, 6, pp.265–276.
- Canteri, H. & Ghoul, M., 2015. Submerged liquid culture for production of biomass and spores of Penicillium. *Food Reviews International*, 31(3), pp.262–278. Available at: <http://dx.doi.org/10.1080/87559129.2015.1015136>.
- Carrasco-navarro, U. et al., 2016. Proteomic analysis of the signaling pathway mediated by the heterotrimeric Gα protein Pga1 of Penicillium chrysogenum. *Microbial Cell Factories*, 15(173), pp.11–17.
- De Carvalho, C.C.C.R., 2016. Fungi in Fermentation and Biotransformation Systems. *Biology of Microfungi Fungal Biology*, 525.
- Chitarra, G.S. et al., 2004. Germination of Penicillium paneum Conidia Is regulated by 1-octen-3-ol, a Volatil Self-Inhibidor. *Society*, 70(5), pp.2823–2829.
- Cole, G.T. & Kendrick, W.B., 1969. Conidium ontogeny in hyphomycetes. The phialides of Phialophora, Penicillium, and Ceratocystis. *Canadian Journal of Botany*, 47(5), pp.779–789. Available at: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/b69-112>.
- Cordobe, S., Sterner, O. & Ugalde, U., 2002. Conidiation in Penicillium cyclopium Is Induced by Conidiogenone, an Endogenous Diterpene. , 1(5), pp.823–829.
- Departamento Administrativo Nacional de Encuesta, 2016. *Boletín técnico-Encuesta Nacional Agropecuaria 2015*,
- Ene, I. V, Heilmann, C.J., et al., 2012. Carbon source-induced reprogramming of the cell wall proteome and secretome modulates the adherence and drug resistance of the fungal pathogen Candida albicans. , pp.3164–3179.
- Ene, I. V, Adya, A.K., et al., 2012. Host carbon sources modulate cell wall architecture , drug resistance and virulence in a fungal pathogen. *Cellular Microbiology*, 14(June), pp.1319–1335.
- Espinosa-Ortiz, E.J. et al., 2016. Fungal pelleted reactors in wastewater treatment: Applications and perspectives. *Chemical Engineering Journal*.
- Fadila Ayati, Majda Aziza, R.M. and A.A., 2008. Batch cultures of Penicillium camembertii

- on glucose and amino acids – model for growth and ammonium production. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 83, pp.23–33.
- FAO, 2017. <http://www.fao.org> , p.<http://www.fao.org/faostat/en/#data/GA>.
- Fedearroz, 2017. No Title. , p.http://www.fedearroz.com.co/new/apr_public.php.
- Feofilova, E.P. et al., 2012. Fungal spores: Dormancy, germination, chemical composition, and role in biotechnology (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48(1), pp.1–11.
- Fillinger, S. et al., 2001. Trehalose is required for the acquisition of tolerance to a variety of stresses in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Microbiology*, 147(7), pp.1851–1862.
- Fletcher, J. & Morton, A.G., 1970. Physiology of germination of *Penicillium griseofulvum* conidia. *Transactions of the British Mycological Society*.
- Frisvad, J.C., 2015. Taxonomy, chemodiversity, and chemoconsistency of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* species. *Frontiers in Microbiology*, 6(JAN), pp.1–7.
- Frisvad, J.C. & Samson, R.A., 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology*, 2004(49), pp.1–173.
- Gao, L. & Liu, X.Z., 2009. A novel two-stage cultivation method to optimize carbon concentration and carbon-to-nitrogen ratio for sporulation of biocontrol fungi. *Folia Microbiologica*, 54(2), pp.142–146.
- García-rico, R.O. et al., 2009. Effect of a heterotrimeric G protein α subunit on conidia germination , stress response , and roquefortine C production in *Penicillium roqueforti* . pp.123–129.
- García-Rico, R.O., Fierro, F. & Martín, J.F., 2008. Heterotrimeric Galpha protein Pga1 of *Penicillium chrysogenum* controls conidiation mainly by a cAMP-independent mechanism. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 86(1), pp.57–69.
- García-rico, R.O., Francisco, J. & Fierro, F., 2011. Heterotrimeric G a protein Pga1 from *Penicillium chrysogenum* triggers germination in response to carbon sources and affects negatively resistance to different stress conditions. *Fungal Genetics and Biology*, 48, pp.641–649.
- Gutiérrez-Rojas, I. et al., 2015. Carbon and nitrogen sources differently influence

- Penicillium sp . HC1 conidiation in solid and liquid culture. *African Journal of Microbiology Research*, 9(47), pp.2290–2299.
- H.-S. Park and J.-H. Yu, Ark, H.E.E.O.O.P. & U, J.A.E.Y.U.K.Y., 2016. Molecular Biology of Asexual Sporulation in Filamentous Fungi. In *Biochemistry and Molecular Biology, 3rd Editcion The Mycota III*. pp. 1–17.
- Hagiwara, D. et al., 2014. The role of AtfA and HOG MAPK pathway in stress tolerance in conidia of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetics and Biology*, 73, pp.138–149. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2014.10.011>.
- Hallsworth, J.E. & Magan, N., 1996. Culture Age, temperature, and pH affect the polyol and trehalose contents of fungal propagules. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(7), pp.2435–2442.
- Hallsworth, J.E. & Magan, N., 1994. Effect of carbohydrate type and concentration on polyhydroxy alcohol and trehalose content of conidia of three entomopathogenic fungi. *Microbiology*, 140(10), pp.2705–2713.
- Hendriksen, H. V. et al., 1988. Production of mannitol by *Penicillium* strains. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 43(3), pp.223–228.
- Hess, A.W.M., Sassen, M.M.A. & Remsen, C.C., 1968. Surface Characteristics of *Penicillium* Conidia. *Mycologia*, 60(2), pp.290–303.
- Hou, S.H. et al., 2016. Total Syntheses of the Tetracyclic Cyclopiane Diterpenes Conidiogenone, Conidiogenol, and Conidiogenone B. *Angewandte Chemie - International Edition*, 55(14), pp.4456–4460.
- Houbraken, J. & Samson, R.A., 2011. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families. *Studies in Mycology*, 70, pp.1–51.
- Jackson, M.A. & Schisler, D.A., 1992. The composition and attributes of *Colletotrichum truncatum* spores are altered by the nutritional environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(7), pp.2260–2265.
- Jung, B., Kim, S. & Lee, J., 2014. Microcycle conidiation in filamentous fungi. *Mycobiology*, 42(1), pp.1–5.
- Kadam, K.L., Forrest, L.H. & Jacobson, J.A., 2000. Rice straw as a lignocellulosic resource: Collection, processing, transportation, and environmental aspects. *Biomass and Bioenergy*, 18(5), pp.369–389.
- Kausar, H. et al., 2010. Development of compatible lignocellulolytic fungal consortium for rapid composting of rice straw. *International Biodeterioration and Biodegradation*,

- 64(7), pp.594–600. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.06.012>.
- Kim, Y.S. & Hochstrasser, R.M., 2005. Dynamics of amide-I modes of the alanine dipeptide in D₂O. *Journal of Physical Chemistry B*, 109(14), pp.6884–6891.
- Krasniewski, I. et al., 2006. Impact of solid medium composition on the conidiation in *Penicillium camemberti*. *Process Biochemistry*, 41(6), pp.1318–1324. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511306000110>.
- Krull, R. et al., 2013. Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. *Journal of Biotechnology*.
- Leland, J.E. et al., 2005. Effects of media composition on submerged culture spores of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* Part 2: Effects of media osmolality on cell wall characteristics, carbohydrate concentrations, drying stability, and pathogenicity. *Biocontrol Science and Technology*, 15(4), pp.393–409. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09583150400016910>.
- Li, F. et al., 2015. WetA and VosA are distinct regulators of conidiation capacity, conidial quality, and biological control potential of a fungal insect pathogen. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(23), pp.10069–10081. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-015-6823-7>.
- López-Villavicencio, M. et al., 2010. Sex in *Penicillium*: Combined phylogenetic and experimental approaches. *Fungal Genetics and Biology*, 47(8), pp.693–706.
- Malloch, D. & Cain, R.F., 1972. The trichocomataceae: Ascomycetes with *Aspergillus*, *Paecilomyces*, and *Penicillium* imperfect states. *Canadian Journal of Botany*, 50(12), pp.2613–2628. Available at: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/b72-335>.
- Martin, F., A L O M A Liras, P. & Villanueva, J.R., 1974. Changes in Composition of Conidia of *Penicillium notatum* during Germination. *Arch. Microbiol*, 97, pp.39–50.
- Martín, J.F. & Nicolás, G., 1970. Physiology of spore germination in *Penicillium notatum* and *Trichoderma lignorum*. *Transactions of the British Mycological Society*, 55(1), pp.141–148.
- Martin, J.F., Nicolas, G. & Villanueva, J.R., 1973. Chemical changes in the cell walls of conidia of *Penicillium notatum* during germination. *Canadian Journal of Microbiology*, 19(7), pp.789–796. Available at: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/m73-128> [Accessed October 30,

- 2016].
- Martinez, A.T., Calvo, M.A. & Ramirez, C., 1982. Scanning electron microscopy of *Penicillium* conidia. *Antonie van Leeuwenhoek*, 48(3), pp.245–255.
- McIntyre, M., Dynesen, J. & Nielsen, J., 2001. Morphological characterization of *Aspergillus nidulans*: Growth, septation and fragmentation. *Microbiology*, 147(1), pp.239–246.
- Morton, A.G., 1961. The Induction of Sporulation in Mould Fungi. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 153(953), pp.548–569. Available at: <http://rspb.royalsocietypublishing.org/content/153/953/548.short>.
- Moss, M.O., 1987. Morphology and Physiology of *Penicillium* and *Acremonium*. In *Penicillium and Acremonium*. Boston, MA: Springer US, pp. 37–71. Available at: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4899-1986-1_2 [Accessed January 20, 2017].
- Nevarez, L. et al., 2008. Isolation and analysis of differentially expressed genes in *Penicillium glabrum* subjected to thermal stress. *Microbiology*, 154(12), pp.3752–3765.
- Nielsen, J., 1993. A Simple Morphologically Structured Model Describing the Growth of Filamentous Microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering*, 41, pp.715–727.
- Nielsen, J., 1996. Modelling the morphology of filamentous microorganisms. *Trends in Biotechnology*, 14(11), pp.438–443.
- Papagianni, M., 2004. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*.
- Park, H.-S. & Yu, J.-H., 2012. Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi. *Current Opinion in Microbiology*, 15(6), pp.669–677. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527412001221>.
- Paul, G.C. & Thomas, C.R., 1996. A structured model for hyphal differentiation and penicillin production using *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnology and Bioengineering*, 51(5), pp.558–572.
- Pazout, J. & Schröder, P., 1988. Microcycle conidiation in submerged cultures of *Penicillium cyclopium* attained without temperature changes. *Journal of general microbiology*, 134(10), pp.2685–2692.
- Pihet, M. et al., 2009. BMC Microbiology. , 11, pp.1–11.
- Pitt, D. & Mosley, M.J., 1986. Oxidation of carbon sources via the tricarboxylic acid cycle during calcium-induced conidiation of *Penicillium notatum*. *Antonie Van*

- Leeuwenhoek*, 52(6), pp.467–482. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3813521>
http://download.springer.com/static/pdf/847/art:10.1007/BF00423408.pdf?auth66=1379614758_f0504f77f3e6a50827b0d6816587c093&ext=.pdf.
- Pitt, D. & Poole, P.C., 1981. CALCIUM-INDUCED CONIDIATION IN *PENICILLIUM NOTATUM* IN SUBMERGED CULTURE. *Transactions of the British Mycological Society*, 76(21), pp.219–230.
- Pitt, J.I., 1995. Phylogeny in the genus *Penicillium* - a morphologist's perspective. *Canadian Journal of Botany*, 73(Suppl. 1), pp.768–777.
- Rangel, D.E.N. et al., 2015. Stress tolerance and virulence of insect-pathogenic fungi are determined by environmental conditions during conidial formation. *Current Genetics*, 61(3), pp.383–404.
- Remsen, C.C., Hess, W.M. & Sassen, M.M.A., 1967. Fine structure of germinating *Penicillium megasporum* conidia. *Protoplasma*, 64(4), pp.439–451.
- Roncal, T. & Ugalde, U., 2003. Conidiation induction in *Penicillium*. *Research in Microbiology*, 154(8), pp.539–546.
- Ropars, J. et al., 2014. Induction of sexual reproduction and genetic diversity in the cheese fungus *Penicillium roqueforti*. *Evolutionary Applications*, 7(4), pp.433–441.
- Ruijter, G.J.G., Patel, H. & Flitter, S.J., 2003. Mannitol Is Required for Stress Tolerance in. *EUKARYOTIC CELL*, 2(4), pp.690–698.
- Sekiguchi, J., Gaucher, G.M. & Costerton, J.W., 1975. Microcycle conidiation in *Penicillium urticae*: an ultrastructural investigation of conidial germination and outgrowth. *Can J Microbiol*, 21(12), pp.2059–2068. Available at:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1220868.
- Stange, R.R. et al., 2002. Differential effects of citrus peel extracts on growth of *Penicillium digitatum*, *P. italicum*, and *P. expansum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 61(5), pp.303–311. Available at:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0885576503904474>
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0885576503904474> [Accessed October 10, 2016].
- Timberlake, W.E. & Marshall, M. a, 1989. Genetic engineering of filamentous fungi. *Science (New York, N.Y.)*, 244(4910), pp.1313–1317.

- Tudzynski, B., 2014. Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. *Frontiers in Microbiology*, 5(NOV), pp.1–15.
- Ugalde, U., 2006. Autoregulatory signals in mycelial fungi. In *Growth, Differentiation and Sexuality*. pp. 203–213. Available at: http://link.springer.com/chapter/10.1007/3-540-28135-5_11.
- Uribe-Vélez, D., 2012. *Conozcamos el componente biológico del suelo para un desarrollo sostenible del cultivo de arroz*,
- Vergara, B.S., Lopez, F.S.S. & Chauhan, J.S., 1936. Morphology and physiology of sponges. *Fauna of Australia*, 1935–36, pp.86–87.
- Visagie, C.M. et al., 2014. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 78(1), pp.343–371. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>.
- Wang, M. et al., 2015. PdbrlA, PdabaA and PdwetA control distinct stages of conidiogenesis in *Penicillium digitatum*. *Research in Microbiology*, 166(December), pp.56–65. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2014.12.003>.
- Wendland, J., 2001. Comparison of morphogenetic networks of filamentous fungi and yeast. *Fungal genetics and biology: FG & B*, 34(2), pp.63–82. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1087184501912903>.
- Wyatt, T.T., Wösten, H.A.B. & Dijksterhuis, J., 2013. *Fungal spores for dispersion in space and time* 1st ed., Elsevier Inc. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-407672-3.00002-2>.
- Yao, G. et al., 2016. *Penicillium oxalicum* PoFlbC regulates fungal asexual development and is important for cellulase gene expression. *Fungal Genetics and Biology*, 86, pp.91–102. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2015.12.012>.
- Ying, S.H. & Feng, M.G., 2004. Relationship between thermotolerance and hydrophobin-like proteins in aerial conidia of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* as fungal biocontrol agents. *Journal of Applied Microbiology*, 97(2), pp.323–331.
- Youngchim, S., Hay, R.J. & Hamilton, A.J., 2005. Melanization of *Penicillium marneffei* in vitro and in vivo Printed in Great Britain. , pp.291–299.
- Zhang, X. et al., 2016. Heat Stress Modulates Mycelium Growth, Heat Shock Protein Expression, Ganoderic Acid Biosynthesis, and Hyphal Branching of *Ganoderma lucidum* via Cytosolic Ca²⁺. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(14),

pp.4112–4125. Available at: <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.01036-16>.